

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS DE L'ESTRADIOL SUR LES CELLULES  
OSTÉOBLASTIQUES EN RELATION AVEC  
UNE OSTÉOPOROSE POSTMÉNOPAUSE

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR  
SARAH HASSON

DÉCEMBRE 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je remercie mon comité, les professeurs François Dragon, Daniel Lajeunesse, Catherine Jumarie et Tatiana Scorza, ainsi que mon directeur de recherche, le professeur Robert Moreau.

Merci aussi à Dominique Labelle de m'avoir si bien accueillie et aidée tout au long de ma maîtrise, à Mathieu Brodeur pour ses commentaires constructifs, les discussions et les « pause santé », à Allain Barnett pour ses conseils en statistiques, et à Martine Lévesque pour s'être tenue à ma droite et m'avoir permis de partager sur d'autres sujets que la biologie.

Finalement, je remercie énormément mes parents pour m'avoir soutenue et permis d'être où je suis présentement, ma sœur Lissou pour avoir été simplement là quand j'en avais besoin ainsi que Geoff pour m'avoir endurée pendant aussi longtemps.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	vii
-------------------------	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....	ix
---	----

RÉSUMÉ.....	xii
-------------	-----

### CHAPITRE I

INTRODUCTION .....	1
--------------------	---

1.1 L'ostéoporose .....	2
-------------------------	---

1.2 Tissu osseux & Remodelage .....	4
-------------------------------------	---

1.3 Ostéoclastes & Résorption osseuse .....	5
---	---

1.4 Ostéoblastes & Formation osseuse .....	6
--	---

1.5 Régulation du remodelage osseux.....	8
--	---

1.5.1 Ostéoclastogenèse.....	8
------------------------------	---

1.5.2 Différenciation ostéoblastique.....	10
---	----

1.6 Ostéoporose postménopause .....	13
-------------------------------------	----

1.7 Les œstrogènes.....	14
-------------------------	----

1.7.1 Les récepteurs œstrogéniques.....	15
---	----

1.7.2 Mécanismes d'action des ERs.....	17
--	----

1.7.3 Les œstrogènes et le métabolisme osseux .....	19
---	----

1.8 Cavéoles & Cavéolines .....	20
---------------------------------	----

1.8.1 Structure des cavéolines .....	21
--------------------------------------	----

1.8.2 Formation des cavéoles.....	21
-----------------------------------	----

1.8.3	<i>Fonctions des cavéoles et cavéolines</i> .....	22
1.9	Cavéoles & Cellules ostéoblastiques .....	24
1.10	Cavéoles & Œstrogènes .....	25
1.10.1	<i>E<sub>2</sub> &amp; cavéoline-1</i> .....	25
1.10.2	<i>Localisation des ERs dans les cavéoles</i> .....	26
1.10.3	<i>ER &amp; cavéoline-1</i> .....	27
1.11	Buts de recherche .....	28
<b>CHAPITRE II</b>		
<b>MATÉRIEL &amp; MÉTHODES</b> .....		<b>36</b>
2.1	Lignées cellulaires .....	36
2.2	Étude de l'expression des récepteurs œstrogéniques .....	37
2.2.1	<i>Expression génique</i> .....	37
2.2.2	<i>Expression protéique</i> .....	38
2.3	Traitements à l'estradiol .....	39
2.3.1	<i>Essais MTT</i> .....	40
2.3.2	<i>Activation de la voie ERK/MAPK</i> .....	40
2.3.3	<i>Mesure de calcium</i> .....	41
2.3.4	<i>Évaluation de l'expression de la cavéoline-1 et du rLDL</i> .....	43
2.4	Analyses statistiques .....	43
<b>CHAPITRE III</b>		
<b>RÉSULTATS</b> .....		<b>45</b>
3.1	Présence des récepteurs œstrogéniques au niveau des cellules MG-63 .....	45
3.1.1	<i>Expression génique</i> .....	45
3.1.2	<i>Expression protéique</i> .....	46

3.2	Effet de l'estradiol sur l'expression de la cavéoline-1 à sous confluence .....	48
3.3	Confirmation de la capacité des MG-63 à répondre à l'estradiol .....	49
3.3.1	<i>Essais MTT</i> .....	49
3.3.2	<i>Activation de la voie ERK/MAPK</i> .....	50
3.3.3	<i>Mesure de calcium</i> .....	51
3.3.4	<i>Expression du rLDL</i> .....	52
3.4	Effet de l'estradiol sur l'expression de la cavéoline-1 à confluence .....	53

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION .....

70

4.1	Expression des ERs dans les cellule MG-63 .....	70
4.1.1	<i>ER<math>\alpha</math></i> .....	70
4.1.2	<i>ER<math>\beta</math></i> .....	72
4.2	Effet prolifératif de l'estradiol sur les cellules MG-63 .....	75
4.2.1	<i>Essais MTT</i> .....	75
4.2.2	<i>Voie ERK/MAPK</i> .....	76
4.3	Entrée intracellulaire de calcium .....	78
4.4	Modulation de l'expression protéique par l'estradiol .....	81
4.4.1	<i>Cavéoline-1 à sous confluence</i> .....	81
4.4.2	<i>rLDL</i> .....	82
4.4.3	<i>Cavéoline-1 à confluence</i> .....	83
4.4.4	<i>Signification physiologique de la réduction de l'expression de la cavéoline-1 par l'estradiol</i> .....	87

## CHAPITRE V

### CONCLUSION.....

90

RÉFÉRENCES .....	92
------------------	----

## LISTE DES FIGURES

FIGURE	PAGE
1.1	Remodelage osseux..... 30
1.2	Régulation de la formation et de l'activité des ostéoclastes..... 31
1.3	Principales étapes de la différenciation ostéoblastique et implication possible de plusieurs facteurs de croissance..... 32
1.4	Domaines structuraux des ERs ..... 33
1.5	Mécanismes d'action des œstrogènes et de leurs récepteurs..... 34
1.6	Structure des cavéoles ..... 35
3.1 a)	Expression des transcrits ER $\alpha$ dans les cellules MG-63 ..... 55
3.1 b)	Expression des transcrits ER $\beta$ dans les cellules MG-63..... 56
3.2 a)	Expression des isoformes ER $\alpha$ dans les cellules MG-63 et MCF-7..... 57
3.2 b)	Expression des isoformes ER $\beta$ dans les cellules MG-63 et Caco-2 ..... 58
3.3 a)	Effets de traitements à l'estradiol sur l'expression de la protéine cavéoline-1 de cellules MG-63 lorsque traitées à sous confluence..... 59
3.3 b)	Représentation graphique des effets de traitements à l'estradiol sur l'expression de la protéine cavéoline-1 de cellules MG-63 lorsque traitées à sous confluence ..... 60
3.4	Effets de traitements à l'estradiol sur la prolifération de cellules MG-63..... 61



3.5 a)	Effet de l'estradiol sur l'activation de la voie ERK/MAPK des MG-63.....	62
3.5 b)	Représentation graphique de l'effet de l'estradiol sur l'activation de la voie ERK/MAPK des MG-63 .....	63
3.6 a)	Effet de l'estradiol sur le relargage de calcium par le réticulum endoplasmique dans les cellules MG-63.....	64
3.6 b)	Effet de l'estradiol sur l'entrée de calcium dans les cellules MG-63.....	65
3.7 a)	Effets de traitements à l'estradiol sur l'expression de la protéine rLDL de cellules MG-63 lorsque traitées à confluence .....	66
3.7 b)	Représentation graphique des effets de traitements à l'estradiol sur l'expression de la protéine rLDL de cellules MG-63 lorsque traitées à confluence.....	67
3.8 a)	Effets de traitements à l'estradiol sur l'expression de la protéine cavéoline-1 de cellules MG-63 lorsque traitées à confluence .....	68
3.8 b)	Représentation graphique des effets de traitements à l'estradiol sur l'expression de la protéine cavéoline-1 de cellules MG-63 lorsque traitées à confluence.....	69

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ANOVA	analyse de variance
APS	persulfate d'ammonium
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BMPs	protéines morphogénétiques osseuses
BSA	sérum-albumine bovin
c-fms	récepteur du facteur stimulant la croissance des macrophages
COX2	cyclo-oxygénase-2
D.O.	densité optique
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco's modified Eagle medium / nutrient mix F12</i>
DMSO	diméthyl sulfoxyde
E <sub>2</sub>	17β-estradiol
ECL+	<i>enhanced chemiluminescence plus</i>
EDTA	acide éthylène diamine tétra acétique
EGTA	acide bis (amino-éthyl) glycol éther NNN'N' tétracétique
eNOS	oxyde nitrique synthétase endothéliale
EREs	éléments de réponses aux œstrogènes
ERs	récepteurs œstrogéniques
ER $\alpha$	récepteur œstrogénique $\alpha$
ER $\beta$	récepteur œstrogénique $\beta$
ERK	kinase régulée par un signal extracellulaire

ERKt	ERK totale
EtBr	bromure d'éthidium
EtOH	éthanol
FBS	sérum bovin foetal
FGFs	facteurs de croissance des fibroblastes
FGF-2	facteur de croissance des fibroblastes de type 2
GPCR	récepteurs couplés aux protéines G
HBSS	<i>HEPES-buffered saline solution</i>
HEPES	N-[2-Hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthanesulfonic acid]
IGEPAL CO-630	2-[2-(4-nonylphénoxy)éthoxy]éthanol
IGFs	facteurs de croissance s'apparentant à l'insuline
IGF-1	facteur de croissance de type 1 s'apparentant à l'insuline
IgG	immunoglobuline de type G
IgM	immunoglobuline de type M
IL	interleukine
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-triphosphate
kDa	kiloDaltons
LPS	lipopolysaccharides
LRP5	protéine apparentée au rLDL de type 5
MAPK	protéine kinase activée par des agents mitogènes
M-CSF	facteur stimulant la croissance des macrophages
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MeOH	méthanol
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
nm	nanomètre
NO	oxyde nitrique
NOS	oxyde nitrique synthétases

OPG	ostéoprotégérine
pb	paire de bases
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
pERK	ERK phosphorylée
PGE	prostaglandines de type E
PKC	protéine kinase C
PMSF	phénylméthylsulfonyl fluorure
PTH	hormone parathyroïdienne
PTHrP	protéines s'apparentant à PTH
PVDF	polyfluorure de vinylidène
RANK	récepteur activant NF- $\kappa$ B
RANKL	ligand du récepteur activant NF- $\kappa$ B
rLDL	récepteur de lipoprotéine de faible densité
RT	transcriptase inverse
SDS	sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
SEM	erreur type sur la moyenne
TBS-T	<i>tris buffered saline – tween</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetraméthyléthylènediamine
TGF- $\beta$	facteur de croissance transformant $\beta$
THS	traitements hormonaux substitutifs
TNF- $\alpha$	facteur de nécrose tumorale $\alpha$
U.V.	ultra-violets

## RÉSUMÉ

Lors de l'ostéoporose postménopause, la diminution de la masse osseuse est liée à la réduction de la sécrétion d'œstrogènes. Le tissu osseux est soumis à un renouvellement constant assuré par une résorption (ostéoclastes) et une formation (ostéoblastes) et la perte osseuse provient d'un déséquilibre entre ces deux processus. Les ostéoblastes sont considérés comme les acteurs majeurs de la régulation du remodelage osseux et l'étude de l'effet des œstrogènes sur les fonctions ostéoblastiques est d'une grande importance. La présence des récepteurs œstrogéniques ER $\alpha$  et ER $\beta$  a été confirmée par RT-PCR et immunobuvardage, dans la lignée cellulaire ostéoblastique humaine MG-63. Les traitements à l'estradiol n'ont eu aucun effet sur la prolifération ou l'activation de la voie ERK/MAPK des ostéoblastes. Cependant, il a été possible d'observer une entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire lorsque les cellules étaient traitées avec  $10^{-6}$  M d'estradiol ainsi qu'une régulation dose dépendante de l'expression du récepteur des lipoprotéines de faible densité. Puisque les MG-63 semblent répondre aux œstrogènes, il est possible que cette hormone puisse affecter d'autres voies de signalisation. Les ostéoblastes possèdent de nombreuses protéines de signalisation dans des microdomaines membranaires, les cavéoles, dont la présence est dépendante de la protéine cavéoline-1. Nous nous sommes demandés si l'œstrogène aurait un effet régulateur sur ces unités de signalisation. Au niveau protéique, cette hormone réduit l'expression de la cavéoline-1 selon un schéma biphasique inversé avec une baisse entre 1 et 100 nM. Avec les résultats présentés dans ce mémoire, l'ostéoporose postménopause ne peut être expliquée par une diminution de la prolifération. Il serait donc pertinent de vérifier si cette baisse de la cavéoline-1 se traduit par une réduction du nombre de cavéoles et une modification de l'activité eNOS, enzyme associée aux cavéoles de certains types cellulaires et dont le produit, l'oxyde nitrique, est nécessaire à un métabolisme osseux adéquat.

## **CHAPITRE I**

### **INTRODUCTION**

L'ostéoporose est une maladie d'actualité puisque, depuis une cinquantaine d'années, son incidence est en constante augmentation en raison du vieillissement de la population des pays industrialisés. Elle se caractérise par une forte diminution de la qualité et de la quantité de la masse osseuse, entraînant ainsi un risque accru de fractures. Présentement, elle affecte plus de 1.4 million de Canadiens, et dans la population âgée de plus de 50 ans, 1 femme sur 4 et 1 homme sur 8 sont touchés par cette maladie; cependant, elle peut frapper à tout âge. Son coût financier, estimé à 1.3 milliard \$ chaque année, résulte principalement de la morbidité associée aux fractures.

L'approfondissement des connaissances reliées à la régulation de la formation et de la résorption osseuse, dans le cadre d'un métabolisme à la fois normal et pathologique, est donc d'une importance primordiale en ce qui concerne le développement de meilleures approches thérapeutiques pour le traitement ainsi que la prévention de l'ostéoporose.

Tout au long de la vie adulte, l'os est normalement soumis à un renouvellement constant (résorption par les ostéoclastes et formation par les ostéoblastes); cependant, dans une condition d'ostéoporose, la dégradation de la matrice osseuse est supérieure à la formation de nouveaux tissus osseux. Ainsi, la conséquence principale de cette maladie est une perte importante de masse osseuse, diminuant ainsi la quantité et la qualité de la structure des os. Ces conditions entraînent donc une plus grande fragilité

osseuse et des risques plus importants de fractures, particulièrement des vertèbres, du haut du fémur (hanche) ainsi que du poignet.

Dans le cas particulier d'une ostéoporose associée à la ménopause (ostéoporose postménopause), la déficience en œstrogènes entraîne une augmentation de la résorption osseuse qui n'est pas compensée par une formation osseuse adéquate [García-Moreno *et al.* 2004; Thijssen 2003]. Plusieurs essais cliniques ont démontré que des traitements hormonaux substitutifs (THS) inhibaient la perte de la masse osseuse dans le cadre d'une ostéoporose postménopause. Cependant, l'utilisation de ces thérapies hormonales n'est plus recommandée dans le traitement de la prévention osseuse due majoritairement au risque élevé de développement de cancers et de maladies cardio-vasculaires qui lui est associée [García-Moreno *et al.* 2004].

Puisque les ostéoblastes sont les cellules impliquées dans la formation osseuse et puisqu'elles contrôlent la régulation de la différenciation et de l'activation des ostéoclastes, ces cellules sont désormais considérées comme une cible importante aussi bien dans la prévention que dans le traitement de l'ostéoporose. Ainsi, la compréhension des mécanismes fondamentaux de signalisation cellulaire et de la régulation de plusieurs fonctions des cellules ostéoblastiques associées au remodelage osseux par les hormones, et en particulier par les œstrogènes, est d'une importance primordiale dans le développement de meilleures approches médicales pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose.

## **1.1 L'ostéoporose**

L'expression clinique la plus fréquente de l'ostéoporose est la fracture qui, par les complications qu'elle peut entraîner, détermine le degré de

gravité de la blessure. Plus particulièrement, l'incidence des fractures liées à la fragilité osseuse, principalement les fractures de la hanche et du poignet, est déterminée par la fréquence et la direction des chutes [Raisz 2005]. Lorsque l'ossature est gravement affaiblie, des gestes banals, comme se baisser ou éternuer fortement, peuvent causer une fracture. Les fractures de la hanche qui sont liées à l'ostéoporose constituent un problème majeur chez les personnes âgées puisque, dans plus de 20% des cas, ces fractures sont mortelles, et qu'environ 50% des aînés qui y survivent souffrent d'invalidité.

L'ostéoporose touche les sociétés industrielles dont l'espérance de vie, et en particulier celle des femmes, s'allonge. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'ostéoporose est une maladie caractérisée par une faible masse osseuse et la détérioration micro-architecturale du tissu osseux, une fragilité osseuse et, par la suite, une augmentation du risque de fractures [World Health Organization 2003]. Plusieurs facteurs de risque sont associés à la pathologie ostéoporotique : les risques d'ordre génétique, d'ordre nutritionnel, d'ordre environnemental, et d'ordre hormonal, lesquels sont tous diversement impliqués selon les âges de vie puisque liés d'une part au capital osseux acquis et d'autre part au rythme de diminution de ce capital [Gennari *et al.* 2005].

La fragilité squelettique peut résulter: (a) d'une insuffisance à produire un squelette possédant une masse et une force optimales durant la croissance; (b) d'une résorption osseuse excessive résultant en une masse osseuse diminuée et une détérioration micro-architecturale du squelette; et (c) une réponse de formation osseuse inadéquate à une augmentation de la résorption durant le remodelage osseux [Raisz 2005].

L'ostéoporose est donc une pathologie dégénérative du tissu osseux étroitement liée au cycle de vie du squelette, et une meilleure compréhension



des mécanismes sous-jacents à son développement est nécessaire afin de mieux cerner toute l'importance de cette maladie en tant que problème majeur de santé publique.

## 1.2 Tissu osseux & Remodelage

L'os est un tissu vivant composé d'une abondante matrice extracellulaire calcifiée. Elle est formée à 90% de fibres de collagène de type I, orientées généralement dans une direction préférentielle, et à 10% de protéines non collagéniques, en grande partie de l'ostéocalcine et de l'ostéonectine [Baron 1993]. La minéralisation de cette matrice extracellulaire se fait par le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; cristaux de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et de phosphate] dans les fibres de collagène. Généralement, ces cristaux sont eux aussi orientés selon la même direction préférentielle que les fibres de collagène. Chez l'adulte, l'orientation préférentielle des fibres de collagène alterne de couche en couche, résultant en une structure lamellaire typique. Ce type d'organisation permet ainsi une plus haute densité de collagène par unité de volume de tissu osseux [Baron 1993].

Comme illustrée à la Figure 1.1, la matrice de l'os est continuellement dégradée et synthétisée par deux types de cellules, les ostéoclastes et les ostéoblastes, respectivement. À l'âge adulte, chaque cycle de remodelage comprend une phase de résorption osseuse de deux à trois semaines, qui précède systématiquement une phase de formation d'environ trois mois, et la phase de formation osseuse est en équilibre avec la phase de résorption jusqu'à l'âge d'environ 30 ans. Ainsi, le pic de masse osseuse est généralement atteint à la troisième décennie et est maintenu jusqu'à la cinquième, lorsque la perte de masse osseuse liée à la vieillesse, autant chez les femmes que chez les hommes, débute et persiste jusqu'à la fin de la

vie [Compston 2001]. En conditions physiologiques normales, la totalité du squelette est régénérée tous les 10 ans à travers des cycles périodiques de destruction de l'ancienne matrice osseuse [Manolagas 2000].

L'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes contrôle donc le processus dynamique de remodelage qui, tout au long de la vie, renouvelle la matrice osseuse, permet de conserver ses propriétés biomécaniques et assure la disponibilité de cette réserve de  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, chez un humain de taille moyenne, approximativement 500 mg de calcium sont retirés des os calcifiés et redistribués dans la circulation sanguine chaque jour, et au même moment, environ 500 mg de calcium sont déposés dans la matrice osseuse par transfert du flux sanguin grâce à l'activité des ostéoblastes lors de la formation osseuse. Ainsi, cet effet tampon, résultant de l'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes, permet de maintenir des niveaux de calcium dans la circulation sanguine d'environ  $10.5 \pm 1$  mg / dl [Noda 2006].

Puisque, à l'âge adulte, le remodelage est un processus continu permettant de maintenir la masse osseuse de l'organisme, un parfait équilibre entre résorption de l'os existant puis formation subséquente de la matrice se trouve être de très grande importance à la fois pour le support mécanique de l'organisme, la protection des organes vitaux et la disponibilité du calcium.

### **1.3 Ostéoclastes & Résorption osseuse**

Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléées (4 à 20 noyaux) normalement retrouvées au contact d'une surface osseuse calcifiée et à l'intérieur d'une lacune résultant de leur propre activité de résorption [Baron 1993]. Ces cellules sont mobiles puisqu'elles résorbent la matrice

osseuse pour former une lacune et se déplacent ensuite pour résorber une autre zone osseuse [Mundy 1993].

Les ostéoclastes proviennent de cellules mononucléaires hématopoïétiques de la moelle osseuse qui circulent dans le flux sanguin et lorsque arrivées à l'os endostéal, prolifèrent, fusionnent pour former des cellules polynucléées, forment des bordures ondulées (ou bordures en brosse), puis résorbent la matrice osseuse [Mundy 1993]. Les bordures ondulées sont de profonds repliements de la membrane plasmique dans la zone longeant la matrice osseuse; cette partie de la membrane plasmique est entourée d'un anneau de protéines contractiles servant à attacher l'ostéoclaste à la surface de l'os [Baron 1993].

L'activité de résorption est effectuée *via* la sécrétion, par les ostéoclastes, d'enzymes protéolytiques et lysosomales ainsi que d'ions hydrogène à travers les bordures ondulées. Les ions hydrogène sécrétés par les pompes à proton permettent le maintien d'un pH acide, lequel dissout les cristaux, exposant ainsi la matrice, et fournit un environnement optimal à la dégradation de la matrice osseuse par les enzymes [Mundy 1993].

#### **1.4 Ostéoblastes & Formation osseuse**

La genèse des ostéoblastes, appelé l'ostéopoïèse, fait appel à des cellules souches mésenchymateuses (cellules souches stromales de la moelle osseuse ou cellules souches de tissu conjonctif), qui, sous stimulation adéquate, prolifèrent et se différencient en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes matures. Après une période de forte activité de sécrétion, les ostéoblastes matures subissent une différenciation terminale pour devenir des ostéocytes entourés par la matrice osseuse ou entrent en apoptose [Baron 1993].

La formation osseuse est effectuée par les ostéoblastes matures atteignant la surface de l'os. Ces cellules synthétisent et sécrètent du collagène de type I qui forme la matrice ostéoïde. La maturation de la matrice se déroule en 3 étapes et doit avoir lieu avant que la matrice osseuse ne puisse être minéralisée. Les fibres de collagène sont tout d'abord déposées rapidement et une couche ostéoïde de plus en plus épaisse est produite. Pendant la seconde étape, le taux de minéralisation de la matrice augmente afin qu'il s'harmonise avec celui de la synthèse de collagène et ainsi, la couche ostéoïde reste constante. Puis, lors de la dernière étape de la formation, le taux de synthèse de fibres de collagène diminue et la minéralisation continue jusqu'à ce que la couche ostéoïde disparaisse [Puzas 1993].

Le processus de minéralisation peut se faire selon deux mécanismes dépendamment du type d'os. Le cartilage calcifié (soit l'ossification endochondrale se définissant par le remplacement d'une matrice cartilagineuse par de l'os, ou l'ossification intramembranaire impliquant la croissance de l'os par opposition) et l'os immature semblent être minéralisés *via* des vésicules matricielles, soit des corps liés à la membrane subissant une exocytose de la membrane plasmique et migrant vers l'espace extracellulaire matriciel. La membrane interne riche en lipides de ces vésicules se trouve être le noyau de la formation des cristaux d'hydroxyapatite, et, éventuellement, la cristallisation se déroule jusqu'à l'oblitération de la membrane vésiculaire produisant ainsi une sphérulite de minuscules cristaux en grappe. Ces sphérulites s'accumulent jusqu'à ce qu'une masse continue minéralisée se retrouve dans l'espace matriciel [Terminé 1993]. Ainsi, la force conduisant à la minéralisation de ces types d'os semble être les cristaux de minéraux associés à la membrane des vésicules matricielles. Dans les os lamellaires plus denses, la minéralisation

a lieu en association avec les fibrilles de la matrice hétéropolymérique (complexe collagène / protéines non collagéniques). Cependant, il est incertain si la force conduisant à la minéralisation est liée au collagène ou aux protéines non collagéniques qui lui sont associées [Terminé 1993].

En plus de posséder un rôle dans la synthèse de collagène et la minéralisation, les ostéoblastes produisent des facteurs de croissance qui se retrouvent ensuite emprisonnés dans la matrice osseuse minéralisée. Ainsi, il semblerait que les ostéoclastes libèrent, durant le processus de résorption, les facteurs de croissance séquestrés. Ces facteurs diffusent ensuite sur une courte distance et stimulent les cellules mésenchymateuses à proliférer et ultimement à se différencier en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes matures. Ces cellules reforment l'os dégradé en remplaçant non seulement le collagène et les minéraux, mais aussi les facteurs de croissance [Puzas 1993].

## 1.5 Régulation du remodelage osseux

### 1.5.1 Ostéoclastogenèse

Depuis longtemps déjà, le concept d'une stimulation de la résorption osseuse nécessitant une interaction entre les cellules des lignées ostéoblastique et ostéoclastique a été proposé mais jusqu'au début des années 80, les mécanismes moléculaires conduisant à cette stimulation demeuraient inconnus [Raisz 2005]. Trois membres de la superfamille des TNF (*facteur de nécrose tumorale*) et de leurs récepteurs sont principalement impliqués, comme le montre la Figure 1.2.

Dans les premières étapes de l'ostéoclastogenèse, le M-CSF (*facteur stimulant la croissance des macrophages*) agit comme un modulateur critique précoce de la différenciation des ostéoclastes. Ce facteur, soit sécrété, soit

lié à la membrane des ostéoblastes matures ou des cellules stromales, interagit avec son récepteur, c-fms (*récepteur du facteur stimulant la croissance des macrophages*), exprimé par les progéniteurs ostéoclastiques, favorisant ainsi leur survie, et par la suite leur réponse à des inducteurs directs de différenciation [Troen 2003]. Dans les stades tardifs de la différenciation ostéoclastique, RANKL (*ligand du récepteur activant NF- $\kappa$ B*) est le facteur critique de l'induction. Les ostéoblastes présentent à leur surface cellulaire RANKL qui active la différenciation des ostéoclastes et permet le maintien de leur fonction en se liant à son récepteur membranaire RANK (*récepteur activant NF- $\kappa$ B*), exprimé par les précurseurs ostéoclastiques ainsi que les ostéoclastes inactifs et actifs [Raisz 2005; Troen 2003].

Cependant, les ostéoblastes synthétisent et sécrètent aussi de l'OPG (*ostéoprotégérine*), un récepteur leurre soluble qui peut bloquer les interactions RANKL/RANK en se liant avec RANKL, et par conséquent, peut empêcher le développement des ostéoclastes et ainsi la résorption osseuse [Raisz 2005; Troen 2003]. Des souris n'exprimant pas RANKL ne possèdent pas d'ostéoclastes fonctionnels et développent de l'ostéopétrose (pathologie se définissant par une formation et une minéralisation osseuses excessives), tandis que des souris déficientes en OPG présentent une résorption accrue et développent de l'ostéoporose, démontrant ainsi le rôle indispensable d'un ratio RANKL/OPG équilibré pour assurer un renouvellement osseux adéquat [Hughes *et al.* 2006]. Dans les ostéoblastes, l'expression de RANKL et d'OPG est régulée de façon inverse et le renouvellement osseux semble déterminé par le ratio RANKL/OPG plutôt que les niveaux absolus de RANKL [Quinn & Gillespie 2005]. Il a aussi été montré que lors d'une condition pathologique, les cellules malignes ou inflammatoires (leucocytes) peuvent augmenter l'ostéoclastogenèse en produisant M-CSF et RANKL, solubles ou

liés à la membrane, ainsi que des PTHrP (*protéines s'apparentant à PTH*), cytokines et des prostaglandines [Raisz 2005].

RANKL est produit par les ostéoblastes en réponse à de nombreux signaux tels que la vitamine D<sub>3</sub>, la PTH (*hormone parathyroïdienne*), le TNF- $\alpha$  (*facteur de nécrose tumorale  $\alpha$* ), les glucocorticoïdes, les PGE (*prostaglandines de type E*), les IL (*interleukine*) -1, -6, -11, -15 et -17, l'hormone thyroïdienne, les LPS (*lipopolysaccharides*), l'histamine, le FGF-2 (*facteur de croissance des fibroblastes de type 2*), l'IGF-1 (*facteur de croissance de type 1 s'apparentant à l'insuline*) et la faible gravité [Troen 2003]. Les PGE sont produites par les ostéoblastes sous l'action inductible de COX2 (*cyclo-oxygénase-2*) en réponse à de nombreux facteurs stimulant la résorption osseuse [Raisz 2005]; cette enzyme fait donc partie d'un cycle de rétro-régulation et semble potentialiser la réponse des ostéoblastes à ces facteurs de stimulation.

De même, la diminution de l'ostéoclastogenèse peut se faire de façon indirecte *via* la diminution de l'expression de RANKL par les ostéoblastes lorsque ces derniers se trouvent en présence d'inhibiteurs de la formation ostéoclastique tels que les IL-4, -10, -12, -13 et -18, le TGF- $\beta$  (*facteur de croissance transformant  $\beta$* ), l'interféron  $\gamma$  et la calcitonine [Troen 2003].

### 1.5.2 Différenciation ostéoblastique

Durant la dernière décennie, d'importantes avancées ont été faites dans la compréhension du contrôle cellulaire et moléculaire de la formation osseuse. Bien que les mécanismes impliqués soient complexes et encore peu connus, un patron général de régulation semble émerger (Figure 1.3) et les facteurs de croissance désormais connus pour induire la différenciation de la lignée ostéoblastique comprennent le TGF- $\beta$ , les FGFs (*facteurs de*

croissance des fibroblastes), le PDGF (*facteur de croissance dérivé des plaquettes*) et les IGFs (*facteurs de croissance s'apparentant à l'insuline*) [Hughes *et al.* 2006].

Dans les premiers stades de différenciation ostéoblastique, le TGF- $\beta$  joue un rôle dans le recrutement des précurseurs des ostéoblastes et la stimulation de la prolifération de ces cellules, tandis que lors des phases plus tardives, le TGF- $\beta$  bloque la différenciation et le processus de minéralisation [Hughes *et al.* 2006].

Un autre groupe de facteur de croissance d'importance majeure dans la différenciation ostéoblastique est la famille des BMPs (*protéines morphogénétiques osseuses*). Les effets des BMPs se situent principalement sur les cellules pluripotentes, capables de se différencier en d'autres types cellulaires mésenchymateux. Dans le cas des os, ce sont les BMP-2, -4 et -6 qui peuvent diriger ces cellules pluripotentes dans la lignée ostéoblastique. De plus, les BMPs peuvent aussi augmenter la différenciation des cellules déterminées vers la lignée ostéoblastique *via* la formation de nodules osseux et l'expression de marqueurs phénotypiques d'ostéoblastes matures [Hughes *et al.* 2006].

La famille des FGFs, et plus spécifiquement le FGF-2 qui est exprimé par les ostéoblastes, se trouve être un autre groupe de facteurs de croissance reconnu pour augmenter la réserve de précurseurs ostéoblastiques. Il semble ainsi que de courts traitements avec FGFs, suivi de son retrait du milieu de culture, possède un effet stimulateur sur les ostéoblastes; en effet, ces facteurs de croissance permettent *in vitro* de stimuler la prolifération des cellules immatures et d'inhiber du même fait la différenciation [Hughes *et al.* 2006].



La principale action du PDGF dans le mécanisme de régulation osseux s'apparente à celle de mitogènes non spécifiques. Bien que ce facteur de croissance soit un mitogène puissant pour les cellules du tissu conjonctif, et qu'il stimule et est synthétisé par les cellules mésenchymateuses ainsi que par les cellules s'apparentant aux ostéoblastes, il ne possède pas de fortes propriétés de différenciation ostéoblastique. Il semblerait cependant que ses effets sur le chimiotactisme cellulaire et la néovasculogénèse rendent la présence de cette famille de facteurs de croissance particulièrement importante lors de la cicatrisation de blessures osseuses [Hughes *et al.* 2006].

L'hormone de croissance et les IGFs sont aussi des facteurs jouant un rôle critique dans le développement du squelette. L'hormone de croissance participe à la régulation de la croissance squelettique et déclenche la libération des IGFs par les cellules cibles. La régulation de ce facteur de croissance est complexe, et les principales hormones régulant le développement squelettique possèdent toutes un effet significatif sur les IGFs comme d'autres facteurs tels que BMP-2, TGF- $\beta$  et FGF. Cependant, la principale action des IGFs dans le système osseux est son implication dans l'augmentation de la prolifération, la promotion des dernières étapes de différenciation ainsi que dans la stimulation de l'activité des ostéoblastes matures [Hughes *et al.* 2006].

Il existe de plus en plus de résultats soulignant le rôle de la signalisation par Wnt dans le contrôle des stades précoces de la différenciation de la lignée ostéoblastique. Les Wnts sont un groupe de plus de 15 molécules de signalisation extracellulaire se liant à leur récepteur, dénommé « frizzled », et possédant comme co-récepteur LRP5 (*protéine apparentée au rLDL de type 5*); la liaison du ligand à son récepteur permet le déclenchement d'une série

de réactions cellulaires, résultant en la stabilisation de la protéine  $\beta$ -caténine qui agit comme co-facteur dans la régulation de la transcription génique [Hughes *et al.* 2006]. Des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que cette voie de signalisation est critique pour la différenciation et la fonction ostéoblastiques [Raisz 2005]. Bien que les mécanismes précis par lesquels la voie Wnt altère l'activité des ostéoblastes demeurent encore obscurs, de plus en plus d'études confirment le fait qu'il existe une interaction entre cette voie de signalisation et les BMPs [Hughes *et al.* 2006; Raisz 2005].

## 1.6 Ostéoporose postménopause

La déficience en œstrogènes qui accompagne la ménopause est un facteur pathogénique majeur de la perte osseuse et pour certaines femmes, cette diminution hormonale peut s'accompagner du développement de l'ostéoporose. Après la ménopause, l'augmentation du remodelage osseux résulte en une perte accélérée d'os. La déficience en œstrogènes permet l'augmentation du taux de recrutement des ostéoclastes et d'unités osseuses subissant un remodelage ainsi que l'extension de la phase de résorption en réduisant l'apoptose ostéoclastique [Stephan *et al.* 2003].

Les THS sont prescrites depuis le début des années 60 et permettent de réduire les symptômes dus à une déficience en œstrogènes et de prévenir l'ostéoporose associée à la ménopause. Ces thérapies résultent majoritairement en une élévation de la densité minérale osseuse durant les premiers 12 à 18 mois de traitements. Cet accroissement de la densité minérale osseuse (entre 3 et 5% mais pouvant atteindre 10%) est attribué à l'augmentation simultanée de la fréquence d'activation des ostéoblastes ainsi que la formation de nouvel os à l'intérieur des cavités de résorption existantes [Compston 2001]. Cependant, bien qu'il ait été démontré que les

hormonothérapies possèdent de nombreux aspects bénéfiques sur plusieurs symptômes, il n'en reste pas moins que l'administration à long terme d'hormones de remplacement augmente le risque de développer d'autres types d'affections, telles que des cancers ou des maladies cardiovasculaires, dépendamment du type d'hormonothérapie [García-Moreno *et al.* 2004; Skouby 2004].

Les ostéoblastes étant les cellules qui régulent la différenciation et l'activation des ostéoclastes et puisque les œstrogènes agissent principalement sur les cellules formant la masse osseuse, l'étude des mécanismes fondamentaux de signalisation cellulaire ostéoblastique se révèle une piste importante dans la prévention et le traitement de l'ostéoporose associée à la ménopause.

### **1.7 Les œstrogènes**

Les œstrogènes sont un groupe de stéroïdes sexuels agissant comme hormones sexuelles primaires femelles. Les trois œstrogènes naturels sont l'estradiol, l'estriol et l'estrone; ils sont tous trois produits dans le corps à partir d'androgènes grâce à l'action de différentes enzymes. Les œstrogènes possèdent, dans plusieurs tissus cibles, de nombreuses actions au niveau de la croissance, de la différenciation et des fonctions cellulaires [Bord *et al.* 2003]. De plus, bien que les THS puissent mener au développement de diverses affections du système cardio-vasculaire, les œstrogènes endogènes sont quand même reconnus pour posséder un rôle cardio-protecteur en atténuant l'effet de l'athérogenèse (altération dégénérative des parois internes des vaisseaux sanguins avec formation de dépôts lipidiques). Les œstrogènes augmentent la capacité de certains types cellulaires à synthétiser du cholestérol mais aussi à accroître la prise de cholestérol dans le milieu

extracellulaire. Cet effet bénéfique est dû en partie au fait que les œstrogènes participent au contrôle de l'expression du rLDL (*récepteur de lipoprotéine de faible densité*) [Hodgin & Maeda 2002; Shanker *et al.* 1998], dont la fonction spécifique est de retirer de la circulation les particules lipoprotéiques riches en cholestérol [Smith *et al.* 2004].

Les mécanismes par lesquels ces actions sont effectuées ne sont pas totalement éclaircis, mais il semble que beaucoup d'entre elles soient assurées par des voies génomiques impliquant l'interaction entre un ligand et son récepteur puis la régulation de l'expression génique. De plus, la transmission des réponses rapides déclenchées par cette hormone est de plus en plus documentée et semble impliquer des voies d'actions non génomiques, dans lesquelles les œstrogènes interagissent avec des récepteurs membranaires menant à l'activation de voies de signalisation intracellulaire [Compston 2001].

#### 1.7.1 Les récepteurs œstrogéniques

Les récepteurs œstrogéniques (ERs) appartiennent à la famille des récepteurs d'hormones stéroïdes et sont considérés comme des facteurs de transcription régulés par leur ligand; ainsi, suite à leur liaison avec leurs ligands respectifs, ces récepteurs régulent à la hausse ou à la baisse l'expression de gènes cibles dans les cellules [Hirata *et al.* 2003].

Jusqu'à présent, seuls deux types de récepteurs œstrogéniques ont été répertoriés par la littérature, soit le récepteur œstrogénique  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) et le récepteur œstrogénique  $\beta$  (ER $\beta$ ). La Figure 1.4 présente les domaines structuraux des ERs. Ces deux récepteurs sont codés par des gènes différents et possèdent une homologie de 96% dans leur domaine de liaison à l'ADN (domaine C) et de 53% dans leurs domaines E et F; cependant, les

domaines A, B et D ne sont pas conservés entre les deux types de récepteurs [Herynk & Fuqua 2004]. De plus, il a aussi été montré, en utilisant des souris déficientes en ERs, que ces récepteurs œstrogéniques ne sont pas dépendants l'un de l'autre [Herynk & Fuqua 2004].

Les domaines A et B contiennent le domaine de transactivation ou domaine de fonction d'activation de type 1 (*AF-1*) correspondant à la fonction d'activation indépendante du ligand ainsi qu'un domaine co-régulateur liant une variété de co-activateurs et co-répresseurs des ERs qui module l'activité transcriptionnelle exécutée par les récepteurs œstrogéniques. Les motifs à deux doigts de zinc sont retrouvés dans le domaine C qui code pour le domaine de liaison à l'ADN (*DNA-BD*) responsable de la liaison aux EREs (*éléments de réponses aux œstrogènes*) retrouvés dans les gènes régulés par ces hormones. Le domaine de dimérisation est séparé entre les domaines C et E et permet aux ERs de se dimériser entraînant ainsi la liaison des récepteurs à la totalité du site d'ERE. Le domaine structurel D comprend la région charnière (*hinge region*), une partie du domaine de transactivation dépendante du ligand, *AF-2a*, et une portion du signal de localisation nucléaire. Enfin les domaines E et F sont composés du domaine de liaison du ligand (*ligand-BD*) et du domaine de transactivation dépendante du ligand (*AF-2*), et sont impliqués dans la dimérisation des récepteurs, la liaison des protéines co-régulatrices et des protéines chaperons [Herynk & Fuqua 2004; Hirata *et al.* 2003].

Les ERs possèdent aussi la capacité de former des hétérodimères ainsi que des homodimères. Les deux récepteurs se lient aux œstrogènes avec la même affinité bien que ER $\beta$  possède une activité de transactivation due à *AF-1* plus faible que ER $\alpha$ , alors que l'activité de *AF-2* semble être similaire

pour les deux récepteurs dépendamment du type cellulaire [Herynk & Fuqua 2004].

Un nombre important de variants d'épissage a été retrouvé à la fois pour ER $\alpha$  et pour ER $\beta$ . Ces différentes isoformes d'ARNm peuvent être regroupées en plusieurs types suivant le mécanisme amenant à leur formation. Ainsi, les variants de type 2 possèdent une délétion d'un ou plusieurs exons; les variants de type 3 sont formés par duplication d'un ou plusieurs exons; ceux de type 4 proviennent d'une utilisation alternative des exons non traduits situés en 5'; les variants de type 5 sont formés par l'utilisation alternative de l'exon codant 8s; et finalement, ceux de type 6 relèvent de l'utilisation d'un exon « intronique » et des exons 4 ou 5 et 8 [Hirata *et al.* 2003]. Les variants de type 2, 4 et 6 ont été retrouvés pour les deux ERs tandis que les variants de type 3 ne concerne que ER $\alpha$  et ceux de type 5 uniquement ER $\beta$  [Hirata *et al.* 2003].

### 1.7.2 Mécanismes d'action des ERs

Il existe au moins 4 voies par lesquelles les ERs permettent la transmission des effets biologiques des œstrogènes (Figure 1.5).

Comme mentionné précédemment, les récepteurs œstrogéniques, comme tous les récepteurs de stéroïdes, sont des protéines possédant la capacité d'interagir avec des séquences spécifiques d'ADN. La voie classique ou dépendante du ligand repose sur l'interaction du stéroïde sexuel avec son récepteur intracellulaire (cytoplasmique ou nucléaire) conduisant à la liaison du complexe E<sub>2</sub>/ER avec des ERE, de manière directe ou indirecte, conduisant à la régulation de la transcription génique. [Compston 2001; Hall *et al.* 2001]. La voie indépendante du ligand permet la phosphorylation des ERs et leur liaison aux EREs sans activation des récepteurs par les

œstrogènes; ce type de régulation génique peut se faire par des facteurs de croissance. Une dernière voie génomique est la régulation indépendante des EREs; dans ce mécanisme, le complexe  $E_2/ER$  se lie à d'autres éléments de réponses que les EREs [Hall *et al.* 2001].

Cependant, la rapidité avec laquelle une variété de types cellulaires répondent aux œstrogènes suggère qu'en plus du mécanisme classique d'action génomique, un mécanisme d'action non génomique puisse avoir lieu. Ainsi, l'importance des mécanismes non génomiques, aux cours desquels le ligand interagit avec des récepteurs cytosolique ou de la membrane plasmique, permettrait la transduction des réponses rapides aux stéroïdes [Hall *et al.* 2001; Vanderschueren *et al.* 2004]. Les principales voies non génomiques rapportées par la littérature comme étant celles activées par les œstrogènes *via* ses récepteurs membranaires comprennent, entre autres, la génération de nucléotides cycliques, l'augmentation du niveau de calcium intracellulaire, la production d'oxyde nitrique, l'activation de la voie ERK/MAPK (*kinase régulée par un signal extracellulaire/protéine kinase activée par des agents mitogènes*), l'activation de la protéine p38/MAPK ou encore l'activation de PKC (*protéine kinase C*) [Kelly & Levin 2001; Segars & Driggers 2002].

De plus, une majorité de ces cascades signalétiques semblent provenir de l'activation de voies induites par les protéines G permettant de suggérer que les ERs appartiennent à la large famille des GPCR (*récepteurs couplés aux protéines G*). Ainsi, après l'activation de plusieurs protéines G, le complexe  $E_2/ER$  peut déclencher des cascades signalétiques entraînant différentes fonctions biologiques cellulaires [Levin 2001].

### 1.7.3 Les œstrogènes et le métabolisme osseux

Dans ce mécanisme dynamique qu'est le remodelage osseux, autant la résorption que la formation osseuse sont régulées par une multitude de stimuli externes, entre autres des stimulations mécaniques et hormonales [Lofthouse *et al.* 2001; Puzas 1993]. Une grande variété d'hormones systémiques agit, de façon directe ou indirecte, sur les ostéoblastes et les ostéoclastes modulant le métabolisme osseux. Parmi ces hormones, les stéroïdes sexuels, et en particulier les œstrogènes, jouent un rôle important dans la maturation squelettique des individus en croissance ainsi que dans la prévention de la perte osseuse [Canalis 1993].

Il est maintenant bien reconnu que les ostéoblastes expriment les deux types de récepteurs œstrogènes, ER $\alpha$  et ER $\beta$ ; cependant la présence de ces deux récepteurs dans les ostéoclastes reste controversée [pour une revue du sujet, Vanderschueren *et al.* 2004]. Les œstrogènes exercent des effets significatifs sur la résorption osseuse en altérant principalement la production de facteurs locaux tels les cytokines et les facteurs de croissance, et en réduisant de façon indirecte la fonction des ostéoclastes en inhibant la production, par les ostéoblastes, de certains stimulateurs et inhibiteurs de la différenciation et de l'activation ostéoclastiques (M-CSF; RANKL; IL-1; IL-6; OPG et TNF- $\alpha$ ) [Bord *et al.* 2003; Compston 2001; Troen 2003].

Ainsi, l'action de préservation osseuse des œstrogènes est assurée de façon prédominante par leurs effets indirects sur le nombre et l'activité des ostéoclastes. Dans les ostéoblastes, la modulation de l'expression génique par les œstrogènes a été reportée, comme l'induction des IGFs, du PDGF, de TGF- $\beta$  ou des BMPs. De même, il a aussi été montré que les œstrogènes augmentent l'expression des récepteurs de la vitamine D<sub>3</sub>, de l'hormone de



croissance et qu'elles modulent la réponse des cellules ostéoblastiques à la PTH [Bord *et al.* 2001; Compston 2001].

Des effets non génomiques des œstrogènes *in vitro* ont été rapportés dans les ostéoblastes [Vanderschueren *et al.* 2004], et il a aussi été démontré que la perte de masse osseuse pouvait être renversée par des analogues d'œstrogènes ayant uniquement une action non génomique [Kousteni *et al.* 2002].

En relation avec le métabolisme osseux, les œstrogènes semblent donc agir au niveau de la membrane plasmique, laquelle comporte plusieurs microdomaines pouvant être à même de favoriser l'intégration de l'information au sein des cellules.

## 1.8 Cavéoles & Cavéolines

Les cavéoles sont définies comme étant des invaginations vésiculaires de la membrane plasmique avec une taille variant de 50 à 100 nm de diamètre, et qui sont formées *via* une coalescence de glycolipides, de sphingolipides et de cholestérol (Figure 1.6). La présence de cavéolines, une famille particulière de protéines membranaires, dans ces invaginations fait des cavéoles une forme spécialisée de radeaux lipidiques [Razani & Lisanti 2001]. Les cavéoles peuvent être soit ouvertes en communication directe avec l'espace extracellulaire ou bien fermées pour le traitement des molécules emprisonnées ou pour leur entreposage lors d'un usage ultérieur. La structure et la distribution cellulaires des cavéoles permettent de suggérer que ces unités sont une composante semi-permanente de la surface cellulaire pouvant être déplacée à différents endroits afin de rencontrer les besoins de la cellule [Anderson 1993].

### 1.8.1 Structure des cavéolines

Les cavéolines possèdent un poids moléculaire variant de 21 à 25 kDa, et à ce jour, seulement 3 gènes distincts de cavéolines ont pu être identifiés. Les gènes *cavéoline-1* et *cavéoline-2* codent respectivement pour la cavéoline-1 et la cavéoline-2 qui sont exprimées de façon abondante dans les adipocytes, les cellules endothéliales, et les fibroblastes, tandis que le gène *cavéoline-3* code pour la protéine cavéoline-3, exprimée de manière spécifique dans les muscles [Okamoto *et al.* 1998; Smart *et al.* 1995]. La fonction cavéolaire est intimement dépendante de la présence de ces cavéolines et l'association entre cholestérol et cavéolines est critique pour la biogenèse de ces microdomaines membranaires [Razani & Lisanti 2001].

Les queues C'- et N'-terminales de la cavéoline-1 restent cytoplasmiques et cette protéine est insérée dans les membranes de façon co-translationnelle *via* l'appareil classique de translocation du réticulum endoplasmique [Razani *et al.* 2002]. Les queues terminales dirigent la protéine à la membrane cytoplasmique, avec le domaine d'attachement membranaire C'-terminal permettant la localisation *trans*-Golgi de la protéine tandis que le domaine d'attachement membranaire N'-terminal dirige spécifiquement la cavéoline-1 aux membranes cavéolaires. De plus, trois résidus cystéine de la queue C'-terminale sont palmitoylés rendant ainsi la totalité de la structure protéique plus stable lorsque retrouvée à la membrane [Razani *et al.* 2002].

### 1.8.2 Structure des cavéoles

Les protéines cavéoline-1 se retrouvant dans les cavéoles sont présentes sous forme d'homo-oligomères hautement stables d'approximativement 14 à 16 monomères. Ces complexes sont formés relativement rapidement après la synthèse de la cavéoline-1 par le réticulum

endoplasmique et avant l'achèvement du transit golgien. Ainsi, l'oligomérisation et la biogenèse des cavéoles peuvent se traduire de la manière suivante. Au niveau du réticulum endoplasmique, les cavéoline-1 s'associent entre elles pour former des homo-oligomères de haut poids moléculaire comprenant environ 14 à 16 molécules individuelles de cavéoline-1 qui représentent les unités d'assemblage fonctionnel des cavéoles. Ces homo-oligomères subissent ensuite une seconde étape d'oligomérisation pendant le transport vers la membrane plasmique, très probablement au niveau du *trans*-Golgi. Lors de cette deuxième oligomérisation, les oligomères individuels de cavéoline-1 interagissent les uns avec les autres *via* leur domaine C-terminal formant un réseau extensif au niveau de la membrane plasmique interne. Finalement, ce large réseau d'oligomères semble agir de manière synergique avec le cholestérol afin de distordre la membrane et d'amener ainsi à l'invagination de la cavéole [Razani *et al.* 2002].

### 1.8.3 Fonctions des cavéoles et cavéolines

Les cavéolines sont donc les protéines structurales principales des cavéoles; elles forment un échafaudage sur lequel plusieurs classes de protéines signalétiques peuvent s'associer pour créer des complexes de signalisation pré-assemblés [Okamoto *et al.* 1998]. Plusieurs fonctions ont été proposées pour les cavéoles et les plus communes comprennent des processus d'internalisation ainsi que de signalisation cellulaire; de plus, il a aussi été démontré que la cavéoline-1 pouvait participer à un tri protéique entre la membrane plasmique et le complexe de Golgi [Anderson 1993; Conrad *et al.* 1995; Smart *et al.* 1994]. En ce qui concerne la participation des cavéoles à la signalisation cellulaire, il a été montré que trois classes de molécules se retrouvent dans ces invaginations : des enzymes générant des messagers à partir de substrats retrouvés dans l'environnement cellulaire,

des sites de liaison de haute affinité concentrant les signaux chimiques, ainsi que des substrats qui sont convertis en messagers sous l'action d'enzymes [Anderson 1993]. De plus, beaucoup de molécules de signalisation retrouvées dans les cavéoles sont tenues inactives par leur interaction avec les cavéolines ce qui suggère que ces protéines agissent comme régulateurs négatifs de plusieurs voies de signalisation intracellulaire [Zschocke *et al.* 2003].

De façon plus précise, il semble que la cavéoline-1 participe à l'acheminement du cholestérol synthétisé *de novo* à partir du réticulum endoplasmique jusqu'à la membrane plasmique cellulaire suggérant que la cavéoline-1 potentialise la disponibilité et la livraison du cholestérol vers les cavéoles permettant ainsi son efflux [Anderson 1993; Parton 2001]. De plus, depuis longtemps déjà, l'idée que les cavéoles pouvaient agir en tant que sites d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  a été postulée. Deux molécules membranaires, un canal calcique régulé par  $\text{IP}_3$  (*inositol 1,4,5-triphosphate*) et une pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, connues comme étant cruciales pour la régulation des flux cellulaires de calcium ont été retrouvées dans les cavéoles suggérant que ces invaginations membranaires pourraient fonctionner comme réserve de ces ions divalents [Anderson 1993].

Trois voies de régulation des niveaux de calcium cytoplasmique par les cavéoles ont été proposés par Isshiki & Anderson [1999]. Le premier mécanisme considère les cavéoles comme des sites où la molécule régulatrice  $\text{IP}_3$  est relâchée permettant de déclencher le relargage des ions  $\text{Ca}^{2+}$  par le réticulum endoplasmique. Cette voie impliquerait aussi la participation d'un récepteur lié à une protéine G qui lorsqu'activé par son ligand entraîne la formation d' $\text{IP}_3$  par la PLC. Des récepteurs  $\text{IP}_3$  ont été retrouvés dans les cavéoles permettant de suggérer que les cavéoles

puissent contrôler l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. Ainsi, dans ce deuxième mécanisme de régulation, l' $\text{IP}_3$  produit dans les cavéoles pourrait se lier directement à ses récepteurs situés dans les cavéoles. Finalement, une dernière possibilité envisage que les cavéoles puissent jouer un rôle direct dans l'alimentation du réticulum endoplasmique en ions calciques. Ce mécanisme suppose que les cavéoles agissent comme transporteurs de  $\text{Ca}^{2+}$  stocké à partir du milieu extracellulaire jusqu'aux segments du réticulum [Isshiki & Anderson 1999].

Une autre molécule de signalisation d'importance majeure et dont nombre d'études confirment la modulation par la cavéoline-1 se trouve être l'enzyme eNOS (*oxyde nitrique synthétase endothéliale*). En effet, l'acylation de eNOS permet son ciblage aux domaines lipidiques de la membrane plasmique ainsi qu'au complexe de Golgi. Lorsque cette enzyme est localisée dans les cavéoles mais sans interaction avec la cavéoline-1, son activité enzymatique est optimale; cependant, l'interaction de eNOS avec la protéine cavéoline-1 inhibe sa fonction enzymatique. Cette interaction protéique est interrompue par une augmentation de calcium cytosolique entraînant la liaison du complexe calmoduline- $\text{Ca}^{2+}$  avec eNOS. Ainsi il semblerait que la cavéoline-1 agisse comme un régulateur négatif non spécifique afin d'inhiber l'activité basale de plusieurs protéines de signalisation [Feron & Balligand 2006; Michel 1999].

## 1.9 Cavéoles & Cellules ostéoblastiques

Les cavéoles ont été détectées dans un large spectre de cellules mammifères, mais jusqu'à récemment aucune étude n'avait été conduite dans les cellules osseuses. Finalement, Solomon et ses collaborateurs [2000a] ont démontré la présence de cavéoles et de cavéolines dans des

lignées cellulaires d'ostéoblastes humains et murins; l'expression de la cavéoline a été révélée par RT-PCR et western blot tandis que des techniques de fractionnement membranaire ont montré que les cavéoles étaient retrouvées dans les fractions résistantes au Triton X-100 à 4°C. Puis, dans une étude réalisée par Lofthouse *et al.* [2001], des cavéoles comprenant les isoformes cavéoline-1 et cavéoline-2 ont été révélées dans des ostéoblastes humains normaux. De plus, dans leurs travaux, Solomon *et al.* [2000b] ont montré que les cavéoles retrouvées dans les ostéoblastes étaient enrichies en molécules de signalisation cellulaire, telles que des récepteurs de PDGF, des protéines G, des NOS (*oxyde nitrique synthétases*) ainsi que des tyrosines kinases de la famille Src.

Étant donné le nombre important de processus de signalisation cellulaire impliquant les cavéoles, et étant donné que des molécules à l'origine de ces processus de signalisation ont été retrouvées dans les cavéoles d'ostéoblastes, l'idée générale voulant que ces invaginations puissent jouer un rôle important dans la transduction signalétique au sein des ostéoblastes est de plus en plus confortée.

### 1.10 Cavéoles & Œstrogènes

Des études sur la régulation de l'expression de la cavéoline-1 dans des types cellulaires autres que les cellules ostéoblastiques ont déjà permis de révéler que les œstrogènes ou bien leurs récepteurs influencent l'expression de cette protéine.

#### 1.10.1 $E_2$ & cavéoline-1

En utilisant un modèle *in vivo*, Watanabe *et al.* [2004] ont montré que l'estradiol augmentait l'expression de l'ARNm de la cavéoline-1 dans les

cellules de muscles lisses vasculaires (VSMC) de rats. Dans des VSMC d'humain, cette hormone stimulait la production de cavéoline-1, au niveau du messager ainsi qu'au niveau protéique [Razandi *et al.* 2002]. Dans des cellules endothéliales d'aortes bovines, un traitement avec cette hormone résultait en une augmentation de l'expression de l'ARNm de la cavéoline-1 coïncidant avec une augmentation significative de son expression protéique [Jayachandran *et al.* 2001]. Cependant, dans des cellules de muscle lisse utérin de rats, les traitements avaient pour effet de diminuer le nombre de cavéoles et ainsi le niveau protéique de la cavéoline-1 [Turi *et al.* 2001]. De plus, le traitement à l'estradiol de cellules MCF-7, lignée cellulaire provenant d'un adénocarcinome de glandes mammaires d'humain, entraînait l'inhibition significative de la production de cette protéine [Razandi *et al.* 2002].

#### 1.10.2 Localisation des ERs dans les cavéoles

En considérant que l'existence de ERs membranaires est généralement reconnu, plusieurs études ont tenté de montrer que ces récepteurs se retrouvaient assez spécifiquement dans les cavéoles de différents types cellulaires.

Quelques études, menées dans plusieurs types cellulaires et différents organismes, ont permis de montrer l'interaction de ER $\alpha$  avec la cavéoline-1 dans les cavéoles et que cette liaison directe était critique pour la présence de ER $\alpha$  à la membrane [Razandi *et al.* 2002; Schlegel *et al.* 2001]. De plus, ces recherches ont permis de proposer que le domaine d'assemblage (*scaffolding domain*) de la cavéoline-1 était indispensable à sa liaison avec ER $\alpha$  puis à la translocation subséquente de ce complexe dans les cavéoles [Razandi *et al.* 2002; Schlegel *et al.* 2001]. En ce qui concerne ER $\alpha$ , il semble que le domaine structurel E soit d'importance majeure pour sa

localisation à la membrane plasmique [Acconcia *et al.* 2005; Razandi *et al.* 2003].

De plus, ER $\beta$  a aussi été localisé à la membrane en interaction partielle avec la cavéoline-1 de cellules neuronales [Arvanitis *et al.*, 2004]. De plus, les travaux réalisés par Chambliss et ses collaborateurs [2002] ont permis de montrer que ce récepteur était localisé dans les cavéoles de cellules endothéliales sans pour autant indiquer une co-localisation avec la cavéoline-1.

### 1.10.3 ER & cavéoline-1

La modulation de l'expression de la protéine cavéoline-1 par l'estradiol et la co-localisation des ERs avec la cavéoline-1 ont amené certains chercheurs à s'intéresser aux mécanismes d'action pouvant être impliqués dans cette régulation hormonale.

Razandi et ses collaborateurs [2002] ont démontré qu'après stimulation de 30 minutes des VSMC avec l'estradiol, l'association entre ER $\alpha$  et cavéoline-1 à la membrane plasmique était augmentée de trois fois par rapport au niveau basal. Cependant, cette même stimulation dans les MCF-7 résultait en une inhibition de 67% de l'association de ces deux protéines à la membrane plasmique. Cette différence d'association à la membrane plasmique selon le type cellulaire testé serait expliquée par le fait que dans les cellules MCF-7, l'association entre ER $\alpha$  et la cavéoline-1 est diminuée due à l'activation de ERK, alors que dans les VSMC, l'estradiol inhibe l'induction de ERK et ainsi stimule l'association entre ER $\alpha$  et la cavéoline-1 [Razandi *et al.* 2002].



De plus, dans une lignée cellulaire provenant d'un neuroblastome humain (SK-N-MC), il a été démontré que l'expression de ER $\alpha$  induisait la suppression de la transcription du gène de la cavéoline-1 selon un mécanisme indépendant du ligand tandis que l'expression de ER $\beta$  par ce même type cellulaire n'entraînait aucun changement dans la transcription du gène de la cavéoline-1 [Zschocke *et al.* 2002].

Il a aussi été rapporté que la cavéoline-1 possédait aussi un effet médiateur sur la signalisation de ER $\alpha$ . En effet, Schlegel *et al.* [1999] ont démontré, dans les cellules MCF-7, que la cavoline-1 induisait la translocation indépendante du ligand de ER $\alpha$  depuis le cytoplasme jusqu'au noyau. De plus, l'expression de la cavéoline-1 suffisait pour induire l'activation, indépendante et dépendante du ligand de ER $\alpha$ , de la transcription de gènes rapporteurs conduite par un promoteur contenant des éléments de réponse aux œstrogènes. Cependant, la cavéoline-1 ne possédait aucun rôle de médiation sur l'activité de ER $\beta$  [Schlegel *et al.* 2001].

### 1.11 Buts de recherche

L'étude, dans les cellules ostéoblastiques, de la régulation de l'expression des cavéoles et des cavéolines qui leur sont associées, permettra d'approfondir la compréhension des mécanismes de transduction signalétique impliqués dans la capacité des ostéoblastes à répondre aux œstrogènes de l'environnement et ainsi de suggérer le développement de meilleurs traitements pour la prévention et la thérapie de l'ostéoporose postménopause.

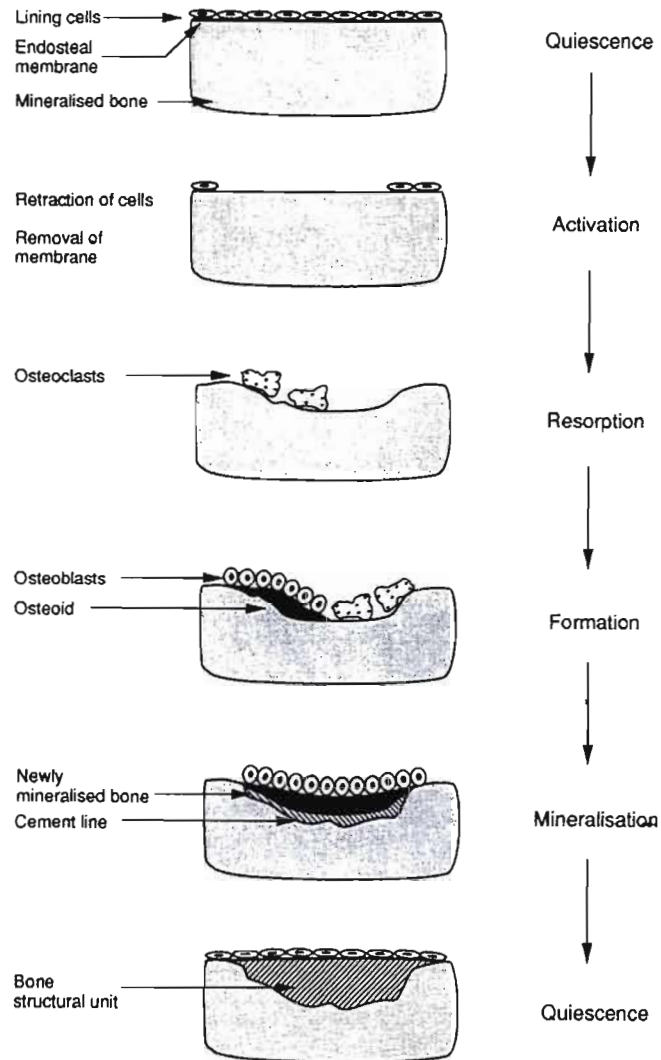
Dans la mesure où les ostéoblastes sont les cellules majoritairement responsables du contrôle de la résorption et de la formation osseuses, et

considérant que les cavéoles modulent la réponse cellulaire, nous avons supposé que les œstrogènes présents dans le milieu modulaient l'expression de la cavéoline-1 de cellules ostéoblastiques.

Dans un premier temps, nous avons vérifié si la lignée cellulaire ostéoblastique utilisée exprimait les deux types de récepteurs œstrogéniques autant au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique, et ainsi si elle possédait la capacité de répondre aux traitements à l'estradiol. Nous avons ensuite tenté d'évaluer si l'expression protéique de la cavéoline-1 était modulée par l'estradiol.

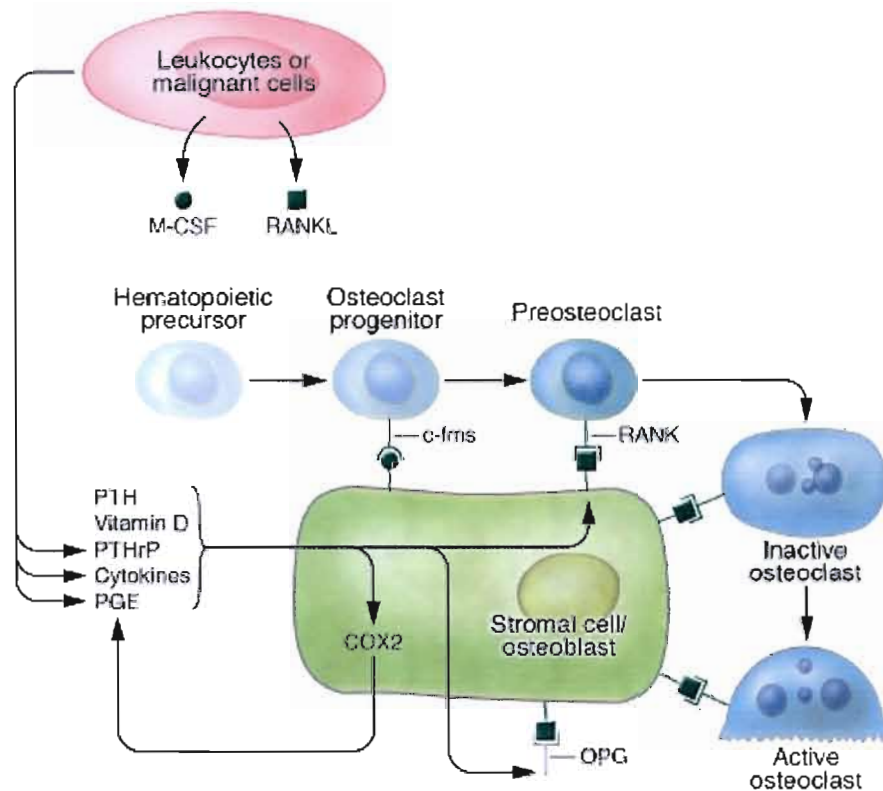
Étant donné que cette modulation n'a pu être démontrée dans les conditions testées, nous nous sommes donc demandés si les traitements œstrogéniques effectués pouvaient réellement entraîner une telle réponse. Ainsi, dans un deuxième temps, nous avons testé la capacité de réponse de la lignée cellulaire aux traitements à l'estradiol en vérifiant si cette hormone favorisait la prolifération, l'activation de la voie ERK, l'influx de calcium ou encore la régulation de l'expression du rLDL.

Finalement, nous avons re-testé les effets de l'estradiol sur la régulation de l'expression protéique de la cavéoline-1 en ajustant les conditions de traitement. Il a ainsi été montré que l'estradiol modulait l'expression cette protéine selon un schéma biphasique inversé.



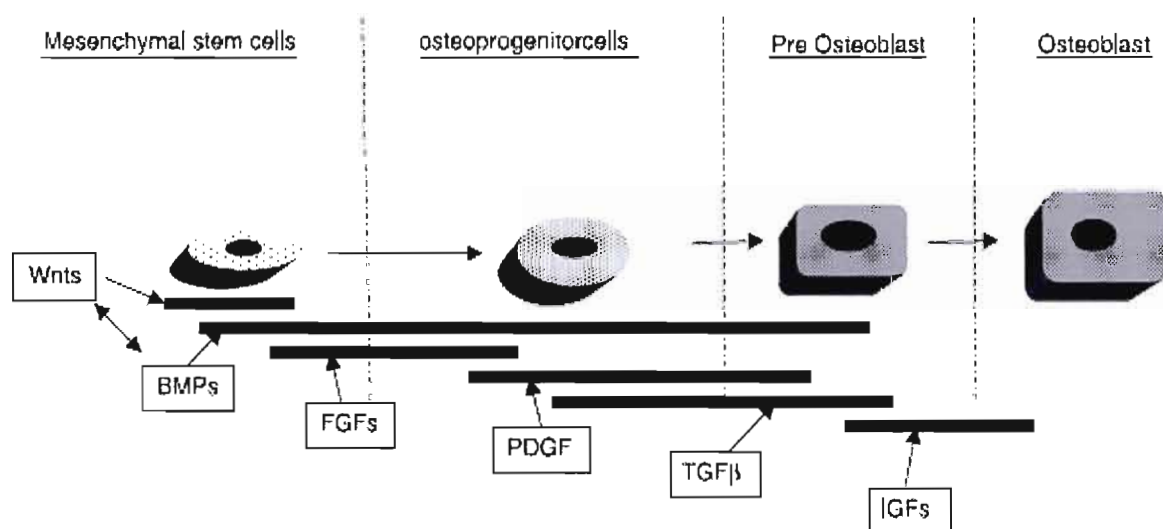
**Figure 1.1 : Remodelage osseux**

Après une phase de quiescence, les ostéoclastes sont activés et résorbent l'os minéralisé. Puis, les ostéoblastes sécrètent des fibres de collagène et les minéralisent pour former la nouvelle matrice osseuse. L'os retourne ensuite en phase de quiescence (tirée de Compston 2001).



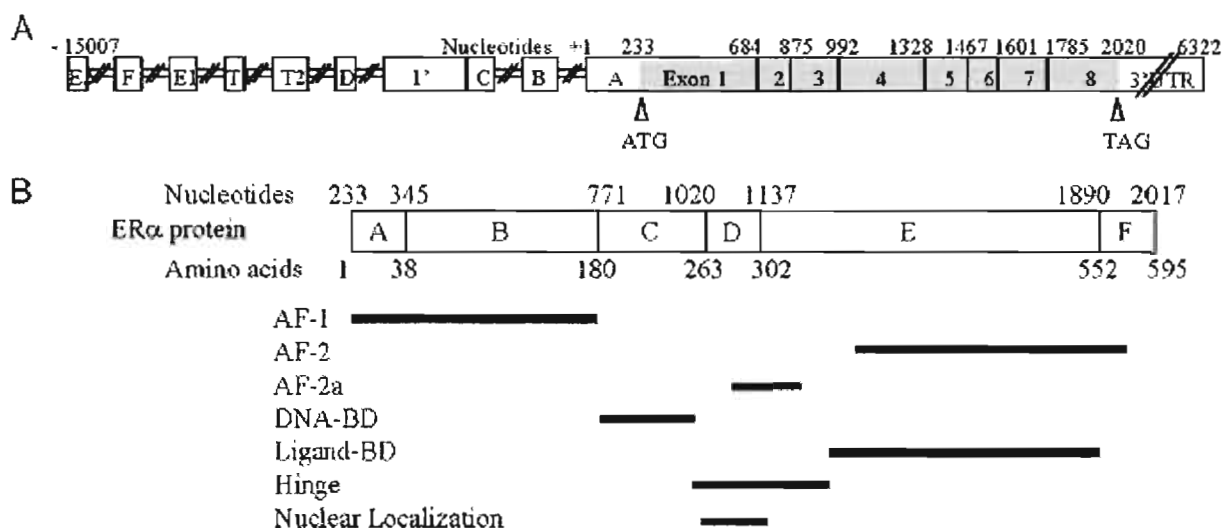
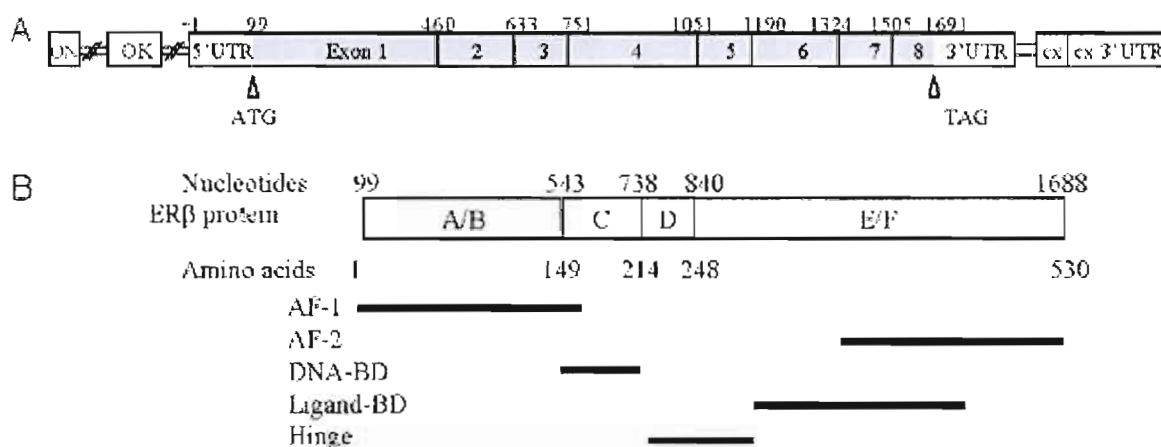
**Figure 1.2 : Régulation de la formation et de l'activité des ostéoclastes**

Le M-CSF, lié à la membrane ou sécrété, interagit avec son récepteur, c-fms, et stimule la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques qui ensuite expriment RANK en tant que pré-ostéoclastes. La différenciation et l'activité des ostéoclastes sont stimulées par l'interaction RANK/RANKL, et celle-ci peut être bloquée par de l'OPG soluble. Des facteurs de résorption osseuse peuvent aussi stimuler l'activité de COX2, qui, à son tour, peut amplifier les réponses à RANKL et OPG en produisant des PGE. En conditions pathologiques, des cellules inflammatoires et malignes peuvent augmenter l'ostéoclastogénèse en produisant M-CSF (lié à la membrane ou soluble), RANKL, PTHrP, PGE et des cytokines (tirée de Raisz 2005).

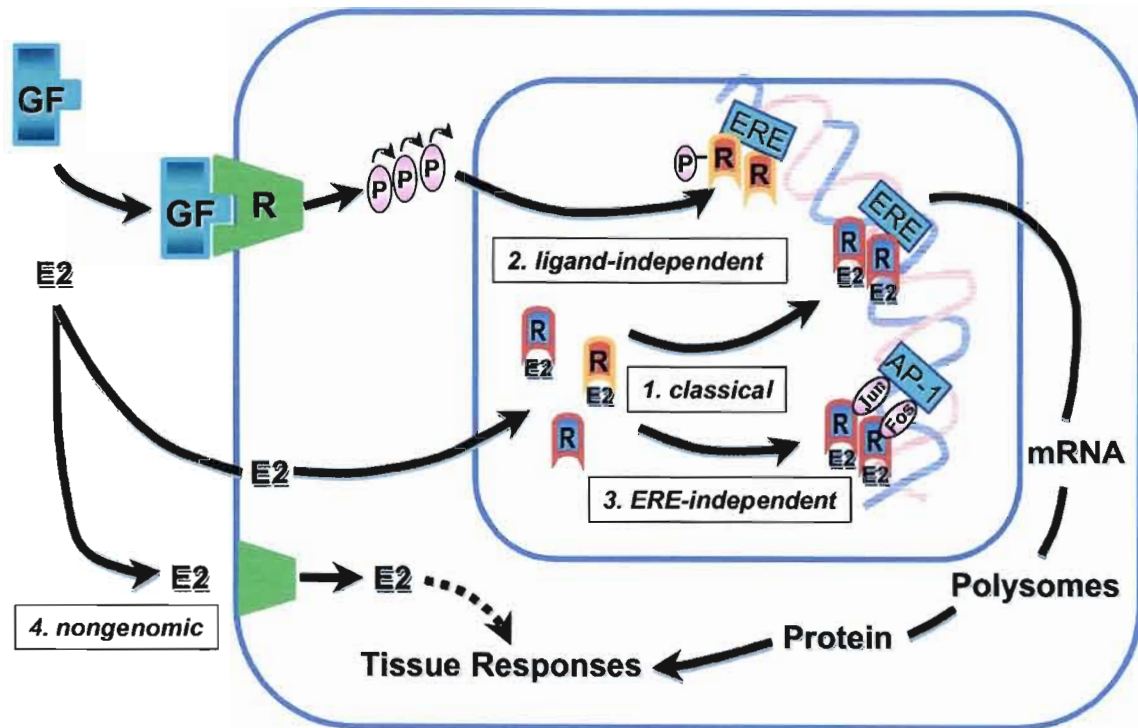


**Figure 1.3 : Principales étapes de la différenciation ostéoblastique et implication possible de plusieurs facteurs de croissance**

Les Wnts semblent jouer un rôle dans les étapes précoces de la différenciation de la lignée ostéoblastique tandis que les protéines appartenant à la famille des BMP induisent la différenciation jusqu'à des stades plus avancés. De plus, il semblerait que ces deux groupes agissent sur les ostéoblastes en s'induisant l'un l'autre. Les FGFs possèdent un rôle prédominant dans la stimulation de la prolifération des cellules constituant le réservoir d'ostéoblastes. Le PDGF et le TGF- $\beta$  agissent principalement aux mêmes étapes du développement de la lignée ostéoblastique; dans les stades précoces, le PDGF et le TGF- $\beta$  favorisent le recrutement et la prolifération des précurseurs alors que dans les étapes tardives, le TGF- $\beta$  induit le blocage de la différenciation. Finalement, les IGFs possèdent un rôle dans les dernières étapes du développement de la lignée ostéoblastique en stimulant la croissance, la différenciation et l'activité des ostéoblastes (modifiée de Hughes *et al.* 2006).

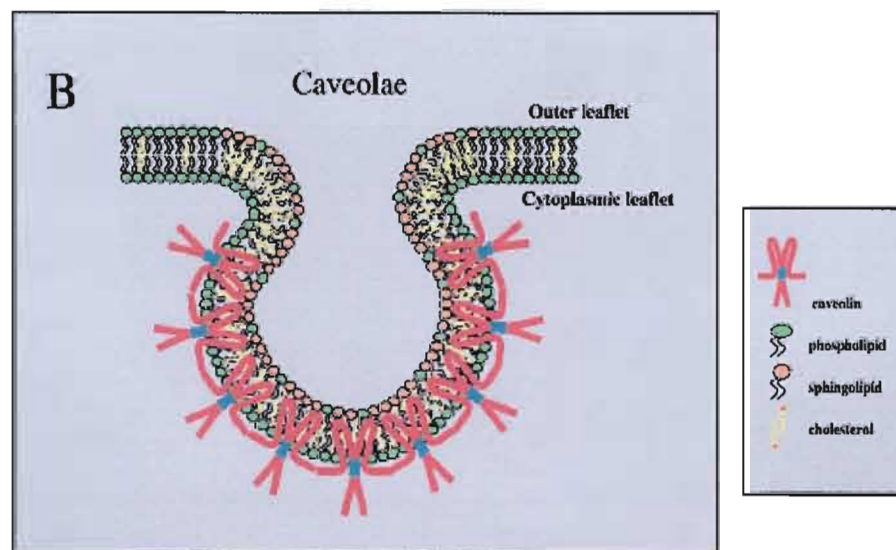
**ER $\alpha$** **ER $\beta$** **Figure 1.4 : Domaines structuraux des ERs**

**A** : Séquence de l'ARNm; les promoteurs alternatifs sont montrés à la gauche de +1. Les boîtes ombragées correspondent à la région codante. Les exons sont numérotés dans leur boîte respective et le numéro correspondant associé aux nucléotides est montré sur le dessus. Le codon *start* (ATG) et le codon *stop* (TAG) sont indiqués en dessous. **B** : Les domaines protéiques sont identifiés de A à F; le nombre de nucléotides correspondant au début de chaque domaine est montré sur le dessus; celui reflétant le nombre d'acides aminés est indiqué en dessous. Les positions relatives de certains domaines fonctionnels connus sont représentées par des bars solides au-dessous du schéma. AF, domaine de transactivation ou fonction d'activation; BD, domaine de liaison (modifiée de Herynk & Fuqua 2004).



**Figure 1.5 : Mécanismes d'action des œstrogènes et de leurs récepteurs**

Les effets biologiques des œstrogènes se font à travers au moins 4 voies. 1. *Voie classique dépendante du ligand*, les complexes E<sub>2</sub>/ER se lient aux EREs des promoteurs cibles conduisant à une régulation de la transcription génique. 2. *Voie indépendante du ligand*, des facteurs de croissance (GF) activent des voies intracellulaires de kinases amenant à la phosphorylation (P) et à l'activation de ER se liant aux EREs de façon indépendante du ligand. 3. *Voie indépendante des EREs*, les complexes E<sub>2</sub>/ER altèrent la transcription des gènes contenant des éléments de réponse alternatifs (AP-1). 4. *Signalisation à la surface cellulaire (voie non génomique)*, E<sub>2</sub> active un site de liaison à la membrane, possiblement une forme de ER associée à des voies de signalisation intracellulaires générant ainsi des réponses rapides (tirée de Hall et al. 2001).



**Figure 1.6 : Structure des cavéoles**

Les cavéoles sont des invaginations vésiculaires de la membrane plasmique formées par une coalescence de cavéolines (localisation intra membranaire et intracellulaire), de cholestérol (localisation intra membranaire), de sphingolipides (localisation au feuillet extracellulaire), et de phospholipides (localisation aux feuillets cytoplasmique et extracellulaire) (modifiée de Razani *et al.* 2002).



## CHAPITRE II

### MATÉRIEL & MÉTHODES

#### 2.1 Lignées cellulaires

La lignée ostéoblastique étudiée a été les cellules MG-63 (ostéoblastes provenant d'un ostéosarcome humain) distribuée par l'ATCC. Ces cellules ont été cultivées dans le milieu de culture complet n°1 (milieu DMEM/F12 [*Invitrogen*] additionné de 2 mM de L-glutamine [*Invitrogen*], 100 U/mL de pénicilline [*Invitrogen*], 100 µg/mL de streptomycine [*Invitrogen*], et 1.2 mg/mL de bicarbonate de sodium [*Fisher*]). Deux autres lignées cellulaires ont été utilisées afin de servir de contrôle positif pour l'expression protéique des récepteurs œstrogéniques, les MCF-7 (cellules épithéliales provenant d'un adénocarcinome de glandes mammaires humaines) et les Caco-2 (cellules provenant d'un adénocarcinome du colon humain), toutes deux fournies par l'ATCC. Les cellules MCF-7 ont été cultivées dans le milieu de culture complet n°2 (milieu MEM [*HyClone*] additionné de 2 mM de L-glutamine [*Invitrogen*], 100 U/mL de pénicilline [*Invitrogen*], 100 µg/mL de streptomycine [*Invitrogen*], 1.2 de mg/mL bicarbonate de sodium [*Fisher*], 0.1 mM d'acides aminés non-essentiels [*HyClone*], et 1 mM de pyruvate de sodium [*Invitrogen*]). Les cellules Caco-2 ont été cultivées dans le milieu de culture complet n°3 (milieu DMEM [*Invitrogen*] additionné de 2 mM de L-glutamine [*Invitrogen*], 100 U/mL de pénicilline [*Invitrogen*], 100 µg/mL de streptomycine [*Invitrogen*], et 1.2 mg/mL de bicarbonate de sodium [*Fisher*]). À confluence, les cellules ont été dispersées avec une solution de Trypsine 0.05% et d'EDTA 0.02% (*Sigma*), puisensemencées à 3 000 cellules/cm<sup>2</sup> (MG-63) et 4 000 cellules/cm<sup>2</sup> (MCF-7 et Caco-2). Après ensemencement dans leur

milieu respectif contenant 10% FBS (*Cansera*), les cellules ont été placées dans un incubateur à 5% de CO<sub>2</sub>, avec une température de 37°C et en atmosphère humide.

## 2.2 Étude de l'expression des récepteurs œstrogéniques

### 2.2.1 Expression génique

Les cellules MG-63 ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri (*Sarstedt*) et récupérées à 90-100% de confluence pour l'isolement d'ARN total à l'aide du TRIzol® Reagent (*Invitrogen*) selon les recommandations du fournisseur. L'ARN obtenu après séchage a été dissous dans 200 µL d'eau ultra pure et quantifié par lecture spectrophotométrique des absorbances A<sub>260 nm</sub> et A<sub>280 nm</sub>. La pureté de l'ARN a été vérifiée en calculant le rapport A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> et son intégrité a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v). L'ADNc a ensuite été synthétisé à l'aide d'hexamères, en employant le kit Omniscript™ RT (*Qiagen*) suivant le protocole fourni par la compagnie. L'ADNc obtenu a ensuite servi pour réaliser une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant le kit Taq PCR Core (*Qiagen*) suivant le protocole fourni par la compagnie. Les amorces suivantes (choisies pour ER $\alpha$ , et tirées de Poola *et al.* [2002] pour ER $\beta$ ) ont été utilisées :

#### Amorces ER $\alpha$ (NM\_000125)

Sens 5'CAGGCCAAATTTCAGATAATCGACG3' (exon 1)

Antisens 5'CGGAACCGAGATGATGTAGCC3' (exon 6)

#### Amorces ER $\beta$ (NM\_001437)

Sens 5'CGCTAGAACACACCTTACCTG3' (exon 1)

Antisens 5'CTGTGACCAGAGGGTACAT3' (exon 7)

Pour l'amplification des transcrits, l'ADNc a été soumis au programme suivant, selon les recommandations du fournisseur (*Qiagen*) : 3 minutes à

94°C pour la dénaturation initiale suivis de 40 cycles comprenant chacun une dénaturation d'1 minute à 94°C, un appariement de 30 secondes à 60°C (ER $\alpha$ ) ou 58°C (ER $\beta$ ) et une élongation de 1 minute à 72°C. Ces cycles ont été suivis d'une élongation finale de 7 minutes à 72°C.

Un volume de 5  $\mu$ L de l'ADN bicaténaire produit a été analysé sur un gel d'agarose 2% (p/v) avec un standard de longueur de 100 pb (*Amersham Biosciences* ou *Invitrogen*). Les bandes des amplicons ont été révélées sous lampe U.V. en utilisant 0.5  $\mu$ g/mL EtBr (*ICN Biomedicals Inc.*).

### 2.2.2 Expression protéique

Après ensemencement des cellules MG-63, MCF-7 et Caco-2 dans des boîtes de Pétri (*Sarstedt*) et une fois qu'une confluence de 90-100% ait été atteinte, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6.6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7.4). Les cellules ont ensuite été homogénéisées avec un tampon de lyse (50 mM Tris à pH 7.4; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 0.5% IGEPAL CO-630; 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>; 0.1 mM PMSF; 10  $\mu$ g/mL leupeptine; 0.5 mM benzamidine; 60 mM octylglucoside; 1  $\mu$ g/mL aprotinine). Les homogénats résultants ont été passés 5 fois dans une aiguille de 28 1/2 G puis centrifugés à 12 500 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant résultant de cette centrifugation correspond au lysat cellulaire total natif, soit non dénaturé.

Ces protéines, resuspendues dans le tampon de Laemmli (12.5 mM Tris-HCl pH 6.8; 2% glycérol; 1%  $\beta$ -mercaptoéthanol; 0.4% SDS; bleu de bromophénol), ont été incubées à 95°C pendant 10 minutes puis soumises à une électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) et réductrice sur gel 12%. Les protéines ont ensuite été transférées sur membranes de PVDF

(*PerkinElmer*) dans un tampon de transfert « *semi-sec* » (1 mM Tris; 9.6 mM glycine; 10% MeOH) avec un courant de 1 mA/cm<sup>2</sup>. Après transfert, les membranes ont été incubées, à 4°C toute une nuit, dans une solution à 5% de lait en poudre dans du TBS-T (1 mM Tris pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.1% Tween 20). Après 3 lavages dans le TBS-T, les membranes ont été incubées, à 4°C pendant 1 heure, avec un anticorps primaire (anticorps monoclonal anti-ER $\alpha$  [*SantaCruz*] 1/1 000; ou anticorps monoclonal anti-ER $\beta$  [*SantaCruz* ou *Sigma*] 1/1 000) dans la solution TBS-T contenant 1% de BSA et 0.05% de NaN<sub>3</sub> (ER $\alpha$ ) ou dans du TBS-T contenant 0.05% de NaN<sub>3</sub> (ER $\beta$  [*Sigma*]). Puis, les membranes ont été lavées 3 fois dans le TBS-T avant d'être incubées pendant 1h30 à température pièce, avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase de raifort (anti-IgG souris [*Chemicon*] 1/5 000; ou anti-IgG chèvre [*Abcam*]) dans le TBS-T contenant 5% de lait en poudre. Après 3 lavages dans la solution TBS-T, les protéines immunodétectées ont été révélées avec un kit ECL+ (*Amersham Biosciences*).

### 2.3 Traitements à l'estradiol

Sauf indication contraire, les traitements à l'estradiol ont toujours été effectués selon la méthodologie suivante. Lorsque le pourcentage de confluence désiré a été atteint, les cellules MG-63 ont été sevrées pendant 24 heures en les plaçant dans le milieu complet n°1 contenant 1% FBS inactivé et « charcoalé » (filtré sur charbon actif, ce qui permet de retirer du sérum tous les composés possédant une action œstrogénique). Après sevrage, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations d'E<sub>2</sub> (*Sigma*) dilué dans de l'EtOH dans le milieu complet n°1 contenant 1% FBS inactivé et « charcoalé » ainsi qu'0.1% EtOH. Les cellules servant de « Contrôle » ont étéensemencées à la même densité et dans le même milieu

que les cellules traitées et ont subi un sevrage de 24 heures. Lors des périodes de traitement, le milieu contenait une concentration équivalente du véhicule.

### 2.3.1 Essais MTT

Les cellules MG-63 ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits (*Sarstedt*) et lorsqu'une confluence de 50% a été atteinte, les cellules ont été sevrées puis traitées avec  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M d'E<sub>2</sub> (ces concentrations sont généralement utilisées dans des études *in vitro* et couvrent un intervalle physiologique et supraphysiologique [Incerpi *et al.* 2003]) pendant 24, 48 et 72 heures. Étant donné que le cycle cellulaire des MG-63 est d'environ 28 heures, un traitement à 24 heures permet d'observer l'effet d'E<sub>2</sub> sur la prolifération avant une première division cellulaire; des traitements à 48 et 72 heures permettent de vérifier l'effet de cette hormone après 2 à 3 divisions dans le cas où E<sub>2</sub> induit de faibles effets sur la prolifération cellulaire. Quatre heures avant la fin de la durée des traitements, une concentration de 0.5 mg/mL de MTT (*Sigma*) a été ajoutée au milieu de culture puis les cellules ont été remises à incuber à 37°C pour le reste de la durée des traitements. À la fin de la période de traitement, le milieu de culture a été retiré puis 200 µL de DMSO (*EMD*) ont été ajoutés dans les puits et les plaques de 96 puits ont été incubées à 37°C jusqu'à solubilisation des cristaux de formazan. Le milieu a ensuite été mélangé par pipetage avant une lecture spectrophotométrique à 575 nm.

### 2.3.2 Activation de la voie ERK/MAPK

Après ensemencement des cellules MG-63 dans des boîtes de Pétri (*Sarstedt*), et lorsque la confluence cellulaire a atteint 80%, les cellules ont été sevrées dans le milieu complet n°1 sans FBS pendant 24 heures. Le lendemain, un traitement avec  $10^{-12}$  et  $10^{-6}$  M d'E<sub>2</sub> a été effectué pour une

durée de 5, 10, 20, 30 et 60 minutes ( ). Un contrôle négatif correspondant à des cellules non traitées ainsi qu'un contrôle positif (cellules traitées avec 10% FBS pendant 5 minutes) ont aussi été effectués.

Les protéines ont été récupérées, dosées et un immunobuvardage de type Western a été réalisé, selon la méthodologie décrite précédemment, avec les anticorps suivants : anticorps monoclonaux primaires anti-pERK, reconnaissant la forme phosphorylée de ERK, et anti-ERKt, reconnaissant ERK indépendamment de son état de phosphorylation, (1/1 000; *Cell Signaling Technology*) et anticorps secondaire anti-IgG lapin (1/5 000; *Chemicon*). Après immunodétection de la protéine ERKt, les membranes ont été dépouillées des anticorps primaire et secondaire en les laissant pendant 1 heure à 37°C dans une solution 200 mM glycine. Puis l'immunodétection de la protéine pERK a été réalisée.

Le niveau d'expression des protéines pERK et ERKt a été quantifié par densitométrie et le ratio pERK/ERKt normalisé par rapport à la condition Contrôle.

### 2.3.3 Mesure de calcium

Les indicateurs fluorescents Fluo-3 AM et Fura-Red AM (*Invitrogen*) ont été utilisés afin de permettre une mesure ratiométrique du calcium intracellulaire proposé par Thomas *et al.* [2000]. Les cellules MG-63 ont étéensemencées dans des Labtek de 4 chambres (*Nalge Nunc*). Une fois la confluence de 70% atteinte, les cellules ont été incubées dans un milieu HBSS (121 mM NaCl; 5.4 mM KCl; 0.8 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 25 mM HEPES; 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>; 6 mM NaHCO<sub>3</sub>; pH 7.3) avec 2 µM de Fluo-3 AM et de Fura-Red AM ainsi qu'un volume équivalent de 20% Pluronic F127 (*Molecular Probes*) puis incubées pendant 45 minutes dans le noir à 37°C. Les cellules ont ensuite

été lavées dans du HBSS puis incubées à température pièce pendant 45 minutes dans le noir afin de permettre la dé-estérification des indicateurs fluorescents. Les cellules ont été observées avec un microscope confocal Nikon TE300 avec un laser (*BioRad*) et un objectif Apochromatic 40X N.A. 1. La longueur d'onde d'excitation était de 488 nm et l'émission a été enregistrée à 515 et 605 nm. Les lectures ont été faites à température pièce dans une configuration à chambre ouverte.

Immédiatement avant de commencer la lecture, les cellules ont été incubées en absence de calcium (HBSS sans  $\text{CaCl}_2$ ). Afin d'observer la présence d'un éventuel relargage de calcium intracellulaire par le réticulum endoplasmique,  $0.5 \times 10^{-9}$ ,  $10^{-9}$  ou  $10^{-6}$  M d' $\text{E}_2$  ou 5  $\mu\text{M}$  de thapsigargine dilués dans du HBSS sans calcium ont été ajoutés après 1 minute 30 d'enregistrement. La thapsigargine est un inhibiteur des SERCA, pompes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases présentes à la membrane du réticulum endoplasmique, qui permettent l'entrée de calcium cytoplasmique dans le réticulum; après incubation des cellules avec ce composé, le réticulum endoplasmique se vide de son calcium et une élévation de la concentration calcique cytoplasmique est observée. Dans cette expérience, la thapsigargine a donc servi de contrôle positif pour le relargage calcique intracellulaire par le réticulum endoplasmique pouvant être induit par  $\text{E}_2$ .

Afin de déterminer si l' $\text{E}_2$  permettait l'ouverture de canaux calciques conduisant à l'entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire, les cellules MG-63 ont étéensemencées, incubées et les indicateurs fluorescents dé-estérifiés de la même manière que précédemment. L'examen des cellules a été effectué en utilisant le même microscope et les lectures ont été faites à température pièce dans une configuration à chambre ouverte. Les cellules ont toujours été gardées dans un milieu HBSS avec calcium et la présence



d'un influx possible de  $\text{Ca}^{2+}$  par activation de l'E<sub>2</sub> a été testée par l'ajout de  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  ou  $10^{-6}$  M d'E<sub>2</sub> dilués dans du HBSS avec calcium après 1 minute 30 d'enregistrement.

#### 2.3.4 Évaluation de l'expression de la cavéoline-1 et du rLDL

Après ensemencement des cellules MG-63 dans des boîtes de Pétri (Sarstedt), et lorsque la confluence cellulaire a atteint 60% (sous confluence) ou 90-100% (confluence), les cellules ont été sevrées puis traitées avec  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M d'E<sub>2</sub> pendant 24 heures. Un contrôle négatif correspondant à des cellules non traitées a aussi été effectué.

Les protéines ont été récupérées, dosées et un immunobuvardage de type Western a été réalisé, selon la méthodologie décrite précédemment (SDS-PAGE 12% pour cavéoline-1; SDS-PAGE 8% pour rLDL), avec les anticorps suivants : anticorps monoclonaux primaires anti-cavéoline-1 (1/1 000; *BD Biosciences*), anti-rLDL (1/1 000; *Research Diagnostics Inc.*) et anti- $\beta$ -actine (1/1 000; *Sigma*) et anticorps secondaires anti-IgG lapin et anti-IgG souris (1/5 000; *Chemicon*).

Le niveau d'expression des protéines cavéoline-1, rLDL et  $\beta$ -actine a été quantifié par densitométrie et le ratio cavéoline-1/ $\beta$ -actine ou rLDL/ $\beta$ -actine a été déterminé puis normalisé par rapport à la condition Contrôle.

## 2.4 Analyses statistiques

Les moyennes et les SEM ont été calculées pour toutes les données de chaque expérience. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel *GraphPad Prism* avec un test t de Student ou une ANOVA suivie d'un test



post hoc approprié. Les valeurs ont été considérées significativement différentes lorsque  $P$  était inférieur à 5%.

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

#### 3.1 Présence des récepteurs œstrogéniques au niveau des cellules MG-63

Puisque les œstrogènes sont reconnus pour causer leurs effets suite à leur interaction avec leurs récepteurs, nous avons voulu, dans un premier temps, vérifier si les cellules MG-63, synthétisaient les ARNm et exprimaient les protéines des deux types de récepteurs œstrogéniques connus, soit ER $\alpha$  et ER $\beta$ .

##### 3.1.1 Expression génique

En observant la Figure 3.1 a), il est possible de remarquer que 2 transcrits de ER $\alpha$  sont retrouvés dans la lignée cellulaire MG-63. Le premier transcrit permet l'amplification d'un amplicon possédant une taille égale à 857 pb tandis que le second transcrit est révélé par un amplicon de 718 pb. Le premier amplicon (857 pb) résulte de l'amplification de l'ARNm du récepteur œstrogénique  $\alpha$  de type sauvage (ER $\alpha$ WT) tandis que le deuxième amplicon (718 pb) provient de l'amplification de l'ARNm du récepteur œstrogénique  $\alpha$  avec délétion de l'exon 5 (ER $\alpha\Delta 5$ ). Ce résultat confirme donc que les ARNm de deux variants de ER $\alpha$  sont produits par les cellules MG-63.

Pour ce qui est des transcrits ER $\beta$  (Figure 3.1 b)), il est possible d'observer que les cellules MG-63 synthétisent 3 différents transcrits de ER $\beta$ . Le premier amplicon est retrouvé à 912 pb, le second se situe à 772 pb et le dernier possède une taille de 639 pb. L'amplicon de 912 pb correspond à l'amplification de l'ARNm du récepteur œstrogénique  $\beta$  de type sauvage

(ER $\beta$ WT), le deuxième amplicon (772 pb) résulte de l'amplification de l'ARNm du récepteur œstrogénique  $\beta$  avec épissage de type 2 et délétion de l'exon 5 (ER $\beta$ 2spl $\Delta$ 5) alors que le troisième amplicon (639 pb) provient de l'amplification de l'ARNm du récepteur œstrogénique  $\beta$  avec délétion des exons 5 et 6 (ER $\beta$  $\Delta$ 5-6). Ce résultat permet donc de confirmer, tout comme précédemment, que les ARNm de trois variants de ER $\beta$  sont produits par les cellules MG-63.

La présence des transcrits correspondant aux ARNm des différents types de récepteurs œstrogéniques  $\alpha$  et  $\beta$  n'indique pas nécessairement la synthèse, par les cellules MG-63, des protéines qui leur sont associées. Ainsi, dans le but de confirmer la présence protéique des récepteurs œstrogéniques dans la lignée cellulaire, des immunobuvardages de type Western avec des anticorps spécifiques aux deux récepteurs ont été effectués.

### 3.1.2 Expression protéique

Étant donné que les premières immunodétections des récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  réalisées n'étaient pas suffisamment nettes, des lignées cellulaires ont été utilisées comme contrôle positif de la technique et de l'efficacité des anticorps.

L'immunobuvardage de type Western présenté à la Figure 3.2 a) permet de visualiser l'expression des isoformes de ER $\alpha$  dans la lignée cellulaire MG-63 ainsi que dans la lignée cellulaire MCF-7 constituant un contrôle positif pour l'expression de ER $\alpha$ . Il est possible d'observer que 2 isoformes de ER $\alpha$  sont toutes deux présentes dans les lignées MG-63 et MCF-7. La première protéine possède un poids estimé à 71 kDa tandis que la seconde protéine

possède un poids approximatif de 39 kDa. De plus, on remarque que les cellules MCF-7 expriment une troisième isoforme d'un poids moléculaire d'environ 44 kDa. La première isoforme protéique de ER $\alpha$  (71 kDa) semble s'apparenter, de part sa taille, à la protéine ER $\alpha$  de type sauvage. La deuxième isoforme retrouvée dans la lignée MG-63 et possédant un poids approximatif de 39 kDa pourrait concorder, en se basant sur sa taille, au transcrit ER $\alpha\Delta 5$ .

La Figure 3.2 b) présente un immunobuvardage de type Western montrant l'expression des isoformes de ER $\beta$  dans les lignées cellulaires MG-63 et Caco-2, cette dernière représentant un contrôle positif pour l'expression de ER $\beta$ . Il est possible d'observer que la lignée MG-63 exprime 2 ou 3 isoformes protéiques différentes de ER $\beta$  selon l'anticorps primaire utilisé. Les trois isoformes détectées avec l'anticorps *Sigma* (Figure 3.2 b) B.) sont aussi retrouvées dans les cellules Caco-2. Pour ce qui est de l'anticorps anti-ER $\beta$  de *Santa Cruz*, la première protéine possède un poids moléculaire apparent de 49 kDa tandis que la seconde isoforme se retrouve à 36 kDa. Ces deux isoformes protéiques pourraient correspondre aux transcrits ER $\beta\Delta 5-6$  et ER $\beta 2spl\Delta 5$ , respectivement. Pour la détection avec l'anticorps primaire de *Sigma*, la première protéine possède un poids moléculaire apparent de 69 kDa, la seconde possède un poids d'environ 49 kDa et la dernière isoforme se retrouve à 41 kDa. La première et la dernière isoforme immunodétectées ne semblent pas s'apparenter aux amplicons des transcrits ER $\beta$ WT et ER $\beta 2spl\Delta 5$  pour lesquels les protéines ont des poids attendus respectifs de 59 et 34 kDa. Cependant, l'isoforme retrouvée à 49 kDa semble correspondre, de part son poids, à la protéine ER $\beta$  possédant une délétion des exons 5 et 6 (ER $\beta\Delta 5-6$ ).

### 3.2 Effet de l'estradiol sur l'expression de la cavéoline-1 à sous confluence

Étant donné que les cavéoles sont considérées comme des invaginations pouvant jouer un rôle important dans la transduction signalétique cellulaire, nous avons voulu, dans un premier temps, vérifier si l'E<sub>2</sub> possédait des effets modulateurs sur l'expression de la cavéoline-1 lorsque les cellules MG-63 se trouvaient à sous confluence. Le choix de traiter les cellules à sous confluence a été déterminé par le fait que quelques articles rapportent une expression des ERs plus élevée lors de conditions de sous confluence et de prolifération cellulaires suggérant une meilleure réponse cellulaire à l'hormone [Brooks *et al.* 1984; Faye *et al.* 1989; Ikegami *et al.* 1994].

La Figure 3.3 a) présente un immunobuvardage de type Western réalisé sur les protéines cavéoline-1 et  $\beta$ -actine après traitement de 24 heures à l'estradiol des cellules MG-63 lorsque ces dernières étaient cultivées à sous confluence. Il est possible d'observer que quelle que soit la concentration ayant servi au traitement ( $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M), le niveau d'expression de la cavéoline-1 n'est pas modulé par l'hormone.

Après analyses densitométriques et statistiques des bandes protéiques, le graphique présenté à la Figure 3.3 b) permet de confirmer qu'aucune différence significative dans la modulation de la protéine cavéoline-1 n'est observable lorsque les cellules MG-63 sont cultivées à sous confluence et traitées à l'E<sub>2</sub>.

### 3.3 Confirmation de la capacité des MG-63 à répondre à l'estradiol

Étant donné que la littérature rapporte plusieurs effets des œstrogènes sur les cellules ostéoblastiques et considérant que l'expression de la cavéoline-1 des cellules MG-63 ne semble pas être modulée par l'estradiol dans les conditions décrites précédemment, nous avons vérifié si les traitements œstrogéniques effectués avaient effectivement un effet sur les cellules MG-63. Ainsi, il a tout d'abord été entrepris de vérifier si les traitements à l'estradiol influençaient la prolifération cellulaire par mesure de l'activité MTT et de l'activation de la voie ERK/MAPK. Nous avons aussi examiné si les traitements possédaient un effet sur les flux calciques ainsi que sur l'expression du rLDL dans les cellules MG-63.

#### 3.3.1 Essais MTT

En utilisant la mesure de l'incorporation de thymidine marqué radioactivement dans l'ADN, Luo & Liao [2003] ont montré que l'estradiol entraînait une réponse proliférative dépendante de la dose des cellules MG-63. Avec cette même méthode, il a aussi été observé que cette hormone influençait de façon dose dépendante la prolifération de cultures primaires d'ostéoblastes humains [Cheng *et al.* 2002].

Une autre manière d'observer si l'E<sub>2</sub> influence la prolifération cellulaire de la lignée MG-63 est d'effectuer des essais MTT. Le MTT sert de substrat à la déshydrogénase cellulaire, enzyme mitochondriale, qui le convertit en cristaux de formazan dont l'intensité de la couleur, lorsque dissous dans le DMSO, est directement proportionnelle à l'activité enzymatique et ainsi au nombre de cellules viables.

Après traitements des cellules MG-63 avec différentes concentrations d'E<sub>2</sub> ( $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M) sur une période de 24, 48 et

72 heures, les résultats obtenus (et présentés à la Figure 3.4) montrent que les traitements avec les différentes concentrations d'estradiol n'affectent pas de façon significative la prolifération des cellules MG-63 et ce, quelle que soit la durée du traitement.

### 3.3.2 Activation de la voie ERK/MAPK

Les œstrogènes sont également reconnus pour entraîner l'activation, dans plusieurs types cellulaires, de la voie ERK/MAPK [Kousteni *et al.* 2001; Segars & Driggers 2002], impliquée dans la prolifération cellulaire, entre autres [Endoh *et al.* 1997; Kousteni *et al.* 2003]. Ainsi, nous avons voulu vérifier si dans la lignée MG-63, les traitements œstrogéniques activaient aussi cette voie. Lorsqu'activée par phosphorylation (pERK), la protéine ERK active à son tour d'autres protéines.

La Figure 3.5 a) présente l'immunobuvardage de type Western détectant pERK et ERKt dans les cellules traitées à l'E<sub>2</sub> pendant 5, 10, 20, 30 ou 60 minutes avec 10<sup>-12</sup> et 10<sup>-6</sup> M d'estradiol. Le contrôle négatif (CTL) correspond à des cellules non traitées et le contrôle positif (FBS) correspond à des cellules traitées avec 10% de FBS pendant 5 minutes. Contrairement à la condition de contrôle positif, les traitements n'ont pas augmenté l'état de phosphorylation de la protéine ERK, quelles que soient la concentration et la durée d'exposition à E<sub>2</sub> associées au traitement.

Les densités des bandes protéiques pERK/ERKt pour les trois différents essais réalisés sont regroupés dans la Figure 3.5 b). Comme observées à la figure précédente, les différentes concentrations d'E<sub>2</sub> pour les différents temps testés n'ont pas significativement augmenté la phosphorylation de la protéine ERK. Il est tout de même possible de remarquer que le FBS, lorsque les cellules ont été traitées avec 10<sup>-12</sup> M d'E<sub>2</sub>, amène une

augmentation significative de la phosphorylation de ERK par rapport à CTL; cette différence significative entre la condition CTL et FBS dans l'augmentation de la phosphorylation de ERK n'est cependant pas observable pour les traitements avec  $10^{-6}$  M d'E<sub>2</sub>. Ce résultat est donc à l'encontre de ce qui avait été attendu puisque le FBS représente le contrôle positif et devrait induire une augmentation de la phosphorylation de la protéine ERK. Nous supposons qu'aucune différence significative par rapport à la condition CTL n'a pu être obtenue dû à la présence d'un trop grand écart-type concernant les données de la condition FBS. Des manipulations supplémentaires auraient permis de réduire cet écart-type et ainsi d'en déduire une augmentation significative de la phosphorylation de ERK par le FBS, comme c'est le cas pour  $10^{-12}$  M d'E<sub>2</sub>.

### 3.3.3 *Mesure de calcium*

Des études indiquent que les œstrogènes ont pour effet d'induire une entrée de calcium dans différents types cellulaires [Perret *et al.* 2001; Wu *et al.* 2005]. De plus, il a aussi été montré que l'E<sub>2</sub> élève la concentration intracellulaire de calcium dans les MG-63 de manière dose dépendante [Chen *et al.* 2001].

Ainsi, afin de vérifier si les traitements œstrogéniques pouvaient augmenter l'entrée d'ions Ca<sup>2+</sup> dans les cellules MG-63, nous avons tout d'abord vérifié si cette hormone entraînait un relargage du calcium intracellulaire stocké dans le réticulum endoplasmique (Figure 3.6 a)). Dans les cellules MG-63 et pour les conditions testées, l'E<sub>2</sub> n'augmente pas significativement le niveau d'ions calciques intracellulaire suite à une vidange du réticulum endoplasmique, en comparaison avec 5  $\mu$ M de thapsigargine. Ce test effectué, nous avons vérifié si l'E<sub>2</sub> pouvait induire l'ouverture des canaux ioniques situés à la membrane plasmique et ainsi entraîner une



augmentation du niveau de calcium intracellulaire par entrée d'ions calciques provenant du milieu extracellulaire.

Comme présenté à la Figure 3.6 b), après ajout de  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  et  $10^{-7}$  M d'E<sub>2</sub> dans un milieu contenant des ions calciums, aucune entrée marquée d'ions Ca<sup>2+</sup> n'est observable. Cependant, lorsque  $10^{-6}$  M d'E<sub>2</sub> est ajouté dans un milieu contenant des ions calcium, une augmentation rapide et soutenue de l'entrée de ces ions dans les cellules MG-63 est observée dès 60 secondes. Le niveau calcique maximal est atteint après 2 minutes 30 suivant l'ajout d'E<sub>2</sub>, et le retour à la concentration intracellulaire basale se fait lentement et n'est toujours pas complété après 9 minutes d'enregistrement.

Les résultats préliminaires (n = 1) obtenus permettent donc d'observer que l'ajout d'estradiol dans le milieu des cellules MG-63 entraîne une élévation de la concentration calcique intracellulaire due à un influx ionique provenant du milieu externe. Ce résultat suggère que les MG-63 répondent à l'estradiol dans nos conditions expérimentales.

### 3.3.4 Expression du rLDL

Comme mentionné précédemment, les œstrogènes possèdent un effet important sur les niveaux plasmatiques de cholestérol en régulant l'expression du rLDL [Hodgin & Maeda 2002; Shanker *et al.* 1998]; ainsi, nous avons entrepris de vérifier si le traitement des MG-63 par différentes concentrations d'E<sub>2</sub> modulait l'expression protéique du rLDL de ces cellules.

L'immunobuvardage de type Western représentatif paraissant à la Figure 3.7 a) a été réalisé après traitement des cellules MG-63, cultivées à confluence, avec  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M d'E<sub>2</sub> pendant 24 heures. Cette figure permet d'observer que plus la concentration d'estradiol

présente dans le milieu de culture cellulaire augmente, plus l'expression de la protéine rLDL augmente, et ce, de manière dose dépendante.

La quantification des résultats (Figure 3.7 b)) confirme que les concentrations comprises entre  $10^{-12}$  et  $10^{-9}$  M d'E<sub>2</sub> augmentent légèrement le niveau d'expression du rLDL des cellules MG-63 alors que des concentrations égales à  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M d'E<sub>2</sub> doublent significativement l'expression du rLDL.

Encore une fois, ce résultat montre bien que la lignée cellulaire étudiée possède la capacité de répondre à l'estradiol et que les traitements effectués sont adéquats et permettent une réponse des cellules MG-63.

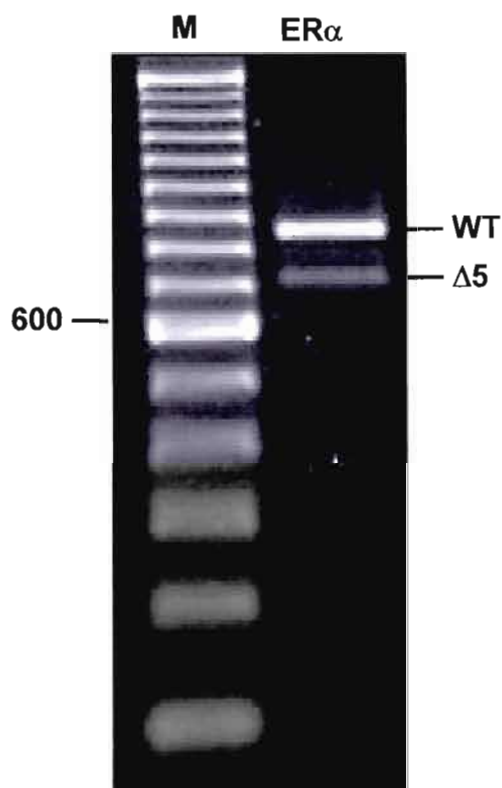
### **3.4 Effet de l'estradiol sur l'expression de la cavéoline-1 à confluence**

L'absence d'effet de l'estradiol sur l'expression de la cavéoline-1 (présentée aux Figures 3.3 a) et 3.3 b)) pourrait donc indiquer que les conditions choisies lors des traitements n'étaient pas idéales pour permettre d'observer un effet sur la modulation de la cavéoline-1 des cellules MG-63. Bien que ces conditions permettent un meilleur niveau d'expression des ERs, on peut supposer qu'elles ne sont pas favorables pour observer une régulation de l'expression de la cavéoline-1 par les œstrogènes. Afin de vérifier si la condition de la proximité cellulaire pouvait être responsable de cette absence d'effet de l'estradiol sur la régulation de la cavéoline-1 des cellules étudiées ou bien pour confirmer si cette protéine n'était simplement pas modulée par cette hormone, nous avons effectué des traitements œstrogéniques lorsque les cellules MG-63 se trouvaient à confluence.

La Figure 3.8 a) montre que l'expression des protéines cavéoline-1 et  $\beta$ -actine après traitement des cellules MG-63, cultivées à confluence, avec  $10^{-8}$

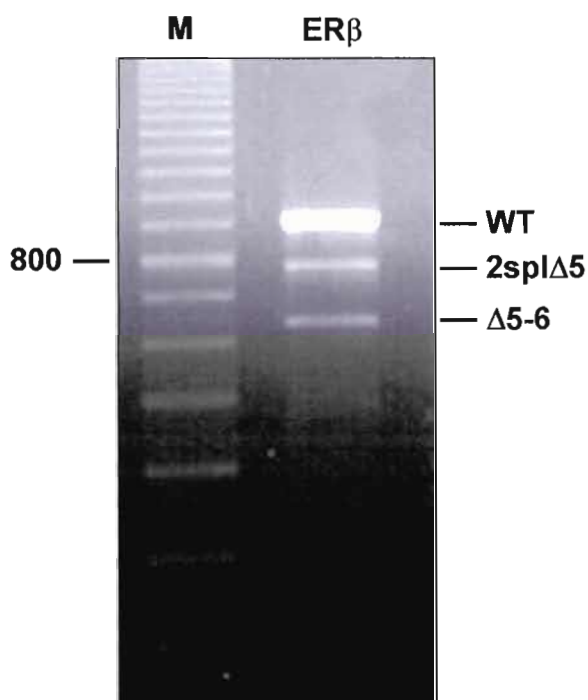
$10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M d'E<sub>2</sub> pendant 24 heures. Cette photographie permet de constater que les concentrations comprises entre  $10^{-12}$  et  $10^{-7}$  M d'E<sub>2</sub> semblent entraîner une baisse du niveau d'expression de la cavéoline-1 tandis que la concentration égale à  $10^{-6}$  M conduit à un rétablissement du niveau d'expression basale.

Après avoir effectué le ratio de densité relative des bandes protéiques cavéoline-1/ $\beta$ -actine, le graphique présenté à la figure 3.8 b) a été généré. Les traitements des cellules MG-63 avec E<sub>2</sub> modulent l'expression de la cavéoline-1 selon un schéma dose dépendant biphasique inversé. Lorsque des concentrations égales à  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  et  $10^{-7}$  M d'E<sub>2</sub> sont présentes dans le milieu, l'expression de la cavéoline-1 diminue de façon significative de 25 à 40%. Enfin, il semble que la concentration de  $10^{-6}$  M d'E<sub>2</sub> permet de ramener cette baisse d'expression à un niveau d'expression de la condition Contrôle.



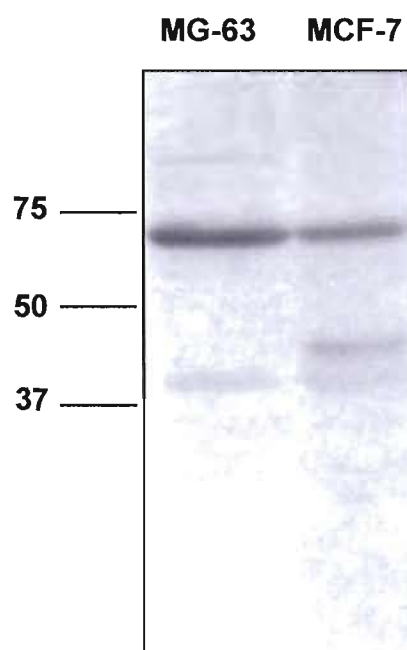
**Figure 3.1 a) : Expression des transcrits ER $\alpha$  dans les cellules MG-63**

À 90-100% de confluence, l'ARN total a été extrait au TRIZOL® puis l'ADNc a été synthétisé par RT avant d'amplifier les séquences par PCR grâce à des amorces spécifiques à ER $\alpha$ . Les produits de RT-PCR ont été séparés sur gel d'agarose 2% et ont été révélés avec 0.5  $\mu$ g/mL EtBr. Résultat représentatif de RT-PCR effectuée à partir d'ARN isolé de trois cultures cellulaires. M : marqueur de taille (pb).



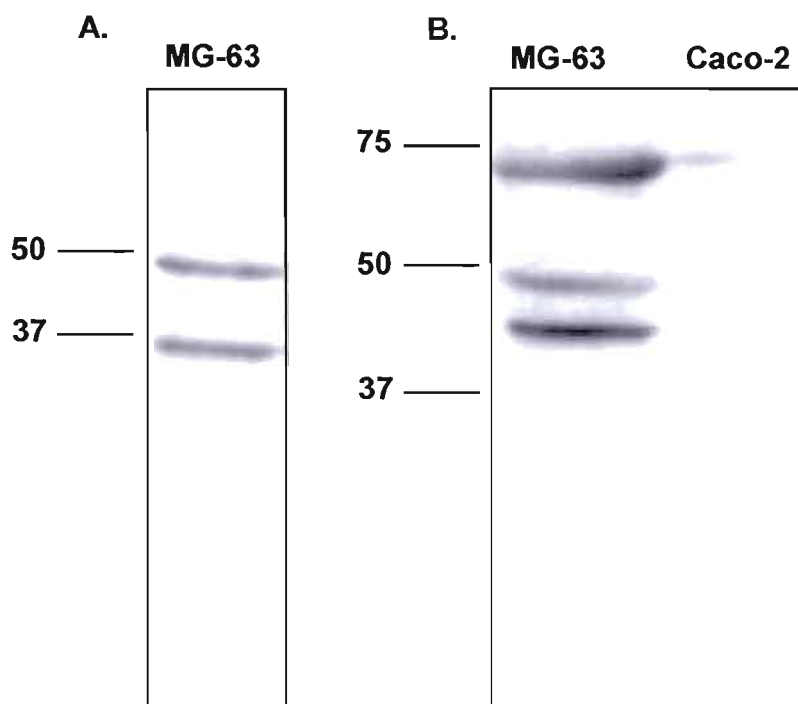
**Figure 3.1 b) : Expression des transcrits ER $\beta$  dans les cellules MG-63**

À 90-100% de confluence, l'ARN total a été extrait au TRIZOL® puis l'ADNc a été synthétisé par RT avant d'amplifier les séquences par PCR grâce à des amorces spécifiques à ER $\beta$ . Les produits de RT-PCR ont été séparés sur gel d'agarose 2% et ont été révélés avec 0.5  $\mu$ g/mL EtBr. Résultat représentatif de RT-PCR effectuée à partir d'ARN isolé de trois cultures cellulaires. M : marqueur de taille (pb).



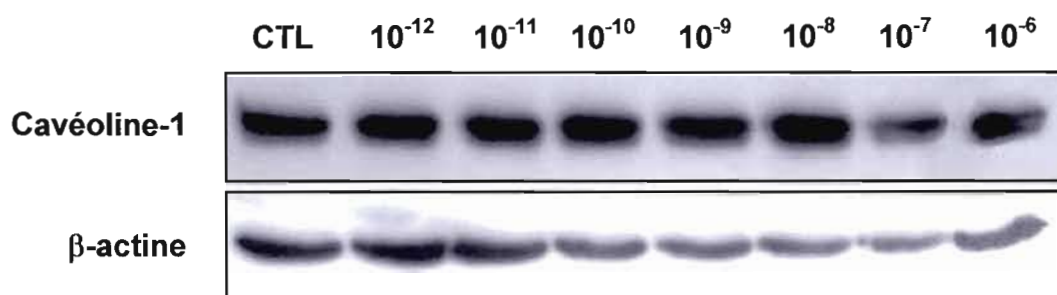
**Figure 3.2 a) : Expression des isoformes ER $\alpha$  dans les cellules MG-63 et MCF-7**

À 90-100% de confluence, les cellules ont été solubilisées avec un tampon de lyse. Les protéines (100  $\mu$ g pour MG-63 et 50  $\mu$ g pour MCF-7) ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel 12% en conditions réductrices puis transférées sur membrane de PVDF. La détection a été conduite avec un anticorps anti-ER $\alpha$  et révélée à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. La révélation a été faite à l'aide d'ECL+. Immunobuvardage représentatif de 3 extractions protéiques. Les poids moléculaires sont en kDa.



**Figure 3.2 b) : Expression des isoformes ER $\beta$  dans les cellules MG-63 et Caco-2**

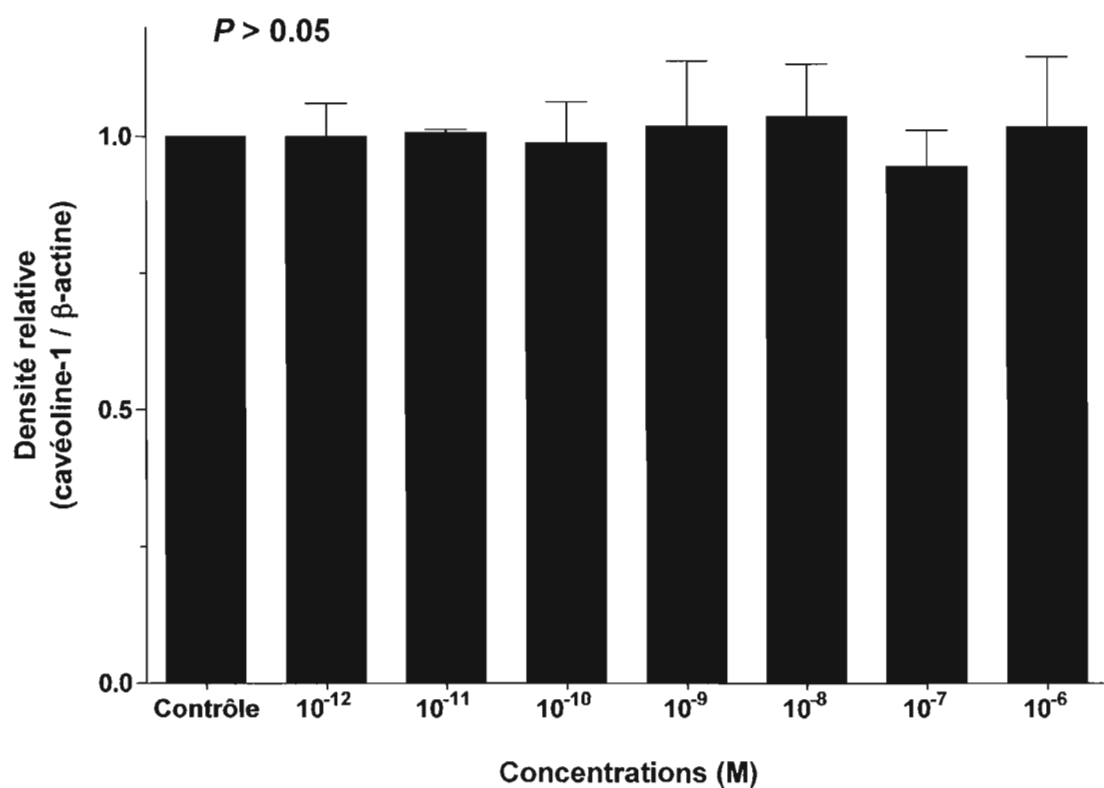
À 90-100% de confluence, les cellules ont été solubilisées avec un tampon de lyse. Les protéines (25  $\mu$ g (A.) et 100  $\mu$ g pour MG-63 et 50  $\mu$ g pour Caco-2 (B.)) ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel 12% en conditions réductrices puis transférées sur membrane de PVDF. La détection a été conduite avec un anticorps anti-ER $\beta$  (A. *Santa Cruz*, et B. *Sigma*) révélée à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. La révélation a été faite à l'aide d'ECL+. Immunobuvardage représentatif de 3 extractions protéiques. Les poids moléculaires sont en kDa.



**Figure 3.3 a) : Effets de traitements à l'estradiol sur l'expression de la protéine cavéoline-1 de cellules MG-63 lorsque traitées à sous confluence**

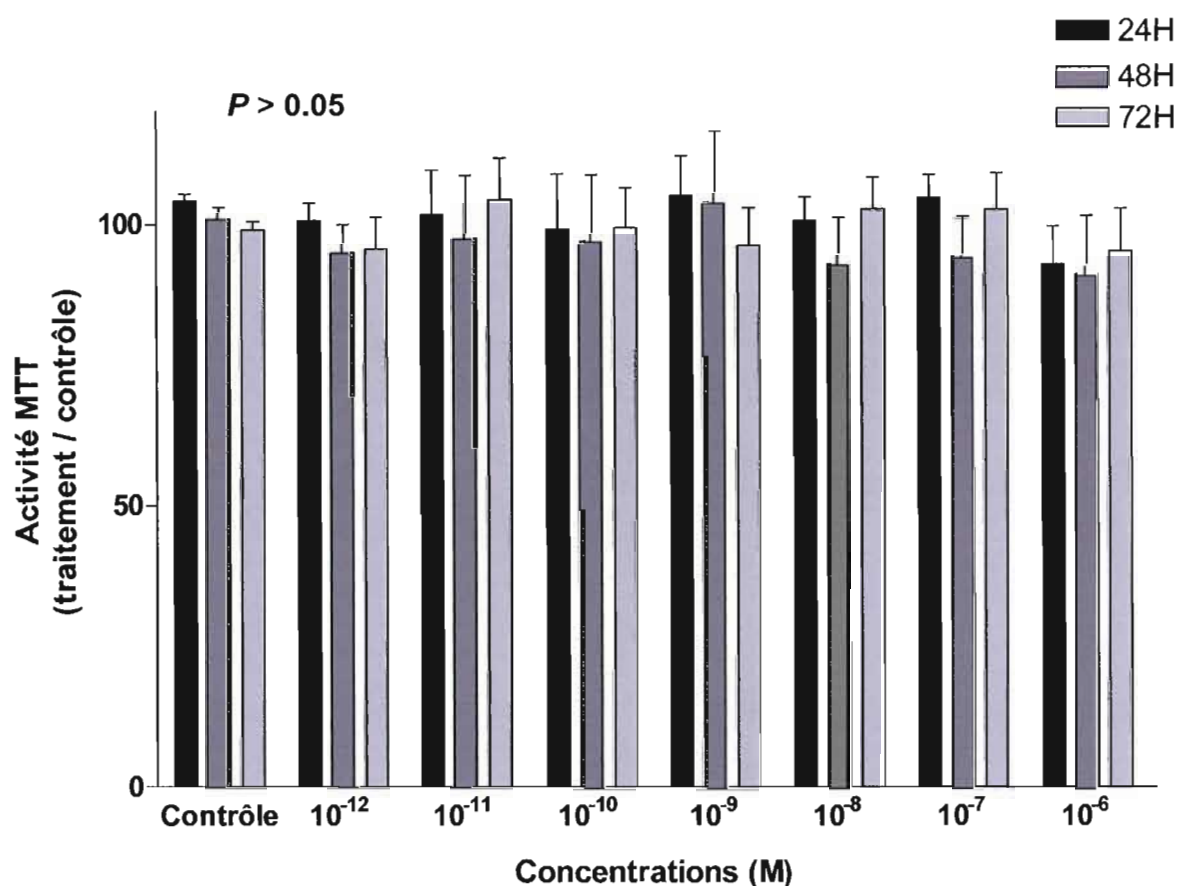
À 60% de confluence, les cellules ont été sevrées pendant 24 heures puis traitées avec  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M d'E<sub>2</sub> pendant 24 heures. La condition contrôle (CTL) correspond à des cellules non traitées. À la fin de la durée des traitements, les cellules ont été solubilisées avec un tampon de lyse puis les protéines (50 µg) ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel 12% en conditions réductrices et transférées sur membrane de PVDF. La détection a été conduite avec un anticorps anti-cavéoline-1 et anti-β-actine, et révélée à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. La révélation a été faite à l'aide d'ECL+. Immunobuvardage représentatif de 5 extractions protéiques.





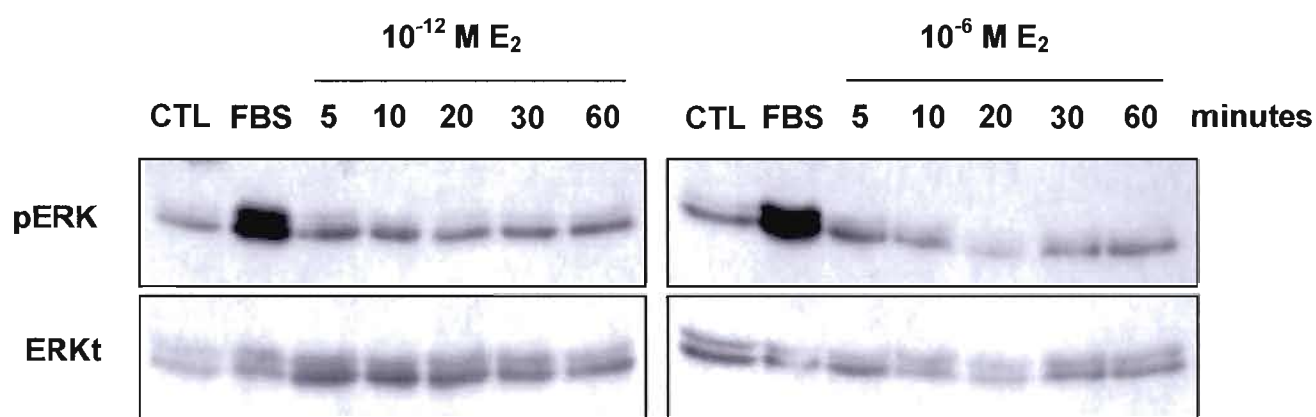
**Figure 3.3 b) : Représentation graphique des effets de traitements à l'estradiol sur l'expression de la protéine cavéoline-1 de cellules MG-63 lorsque traitées à sous confluence**

Densité relative de la protéine cavéoline-1 par rapport à la protéine  $\beta$ -actine normalisée avec la condition Contrôle. La légende est la même que celle présentée à la Figure 3.3 a). Le test statistique réalisé est une ANOVA ( $n = 5$ ; moyennes  $\pm$  SEM).



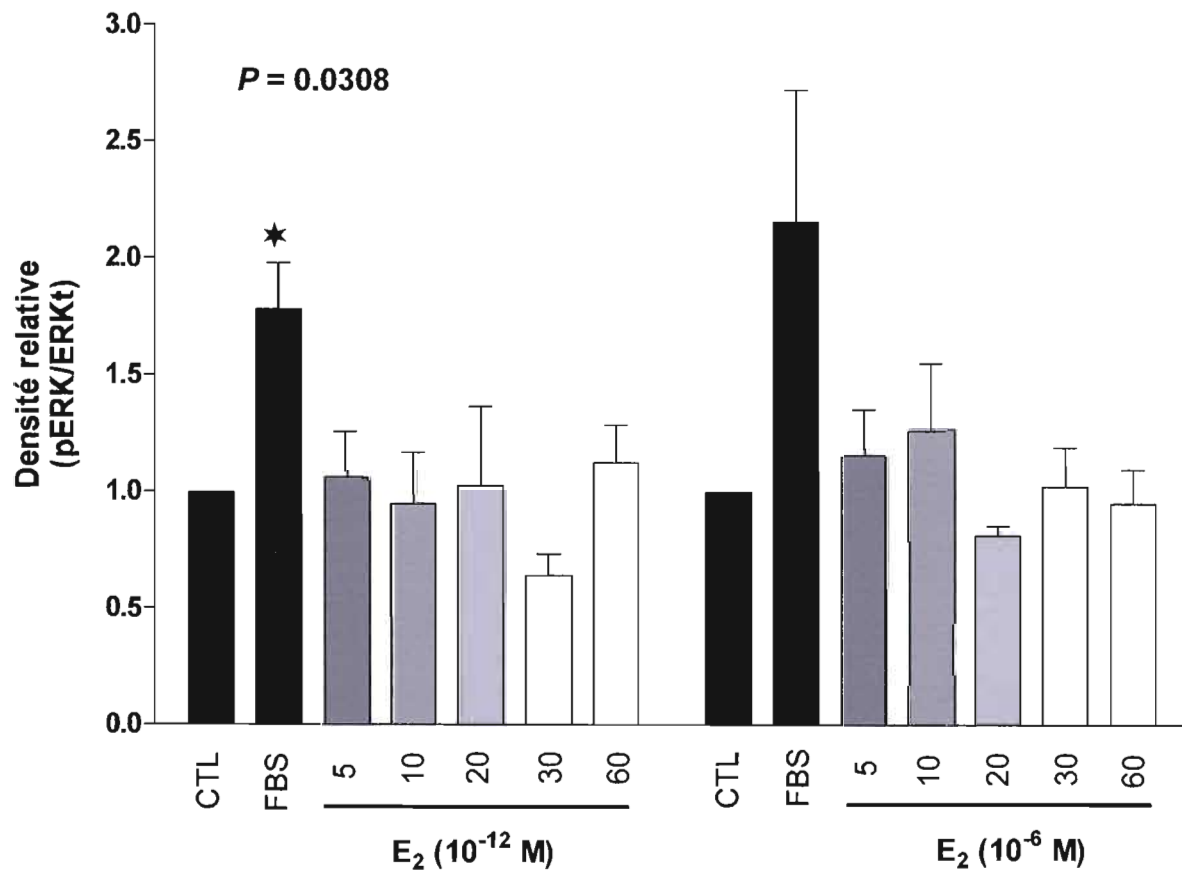
**Figure 3.4 : Effets de traitements à l'estradiol sur la prolifération de cellules MG-63**

À 50% de confluence, les cellules ont été sevrées pendant 24 heures puis traitées avec  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M d'E<sub>2</sub> pendant 24, 48 et 72 heures. La condition Contrôle correspond à des cellules non traitées. Quatre heures avant la fin des traitements, les cellules ont été incubées avec 0.5 mg/mL de MTT à 37°C. Les cristaux insolubles de formazan formés par les enzymes mitochondriales ont été solubilisés avec du DMSO puis la D.O. a été mesurée à 575 nm. Le test statistique réalisé est une ANOVA (*n* = 4; moyennes ± SEM).



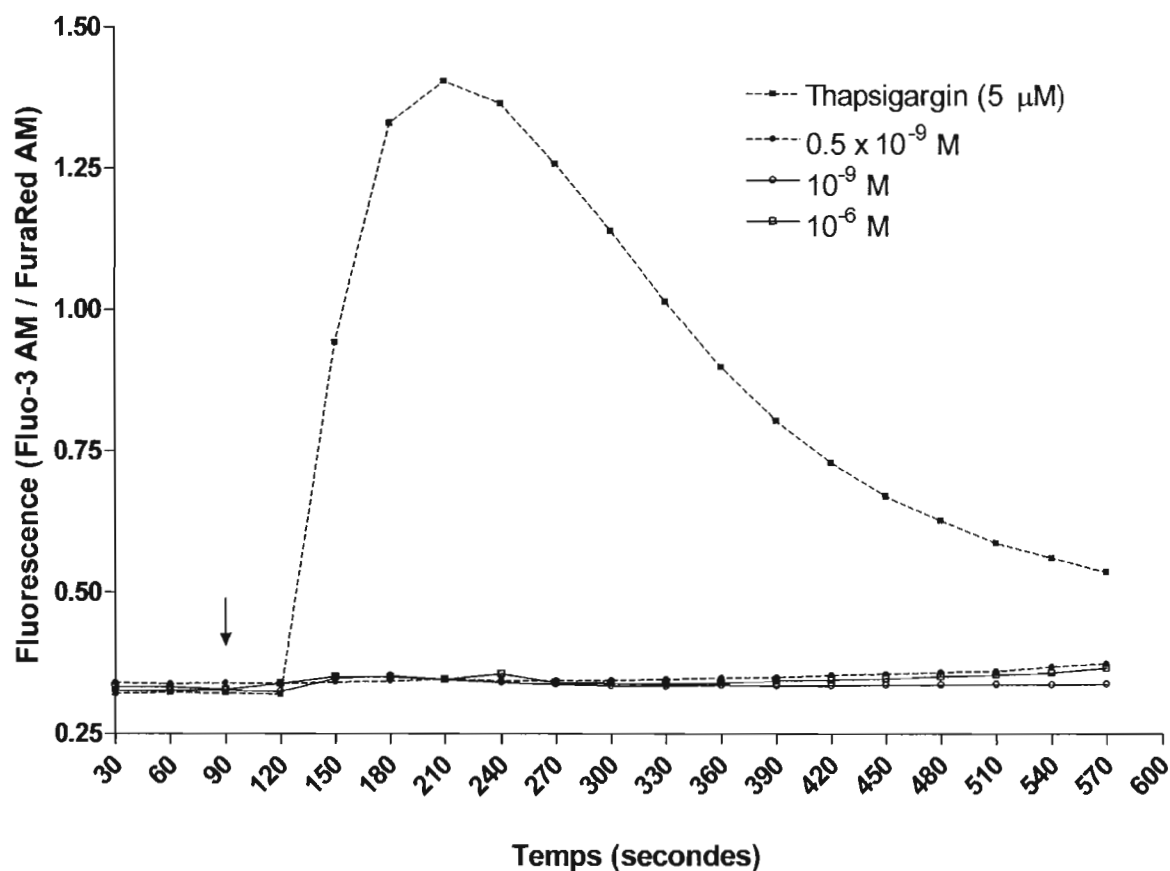
**Figure 3.5 a) : Effet de l'estradiol sur l'activation de la voie ERK/MAPK des MG-63**

À 80% de confluence, les cellules ont été sevrées pendant 24 heures puis traitées avec  $10^{-12}$  et  $10^{-6}$  M d' $E_2$  pendant 5, 10, 20, 30 et 60 minutes. Le contrôle négatif (CTL) correspond à des cellules non traitées et le contrôle positif (FBS) à des cellules traitées avec 10% FBS pendant 5 minutes. À la fin de la durée des traitements, les cellules ont été solubilisées avec un tampon de lyse puis les protéines ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel 12% en conditions réductrices et transférées sur membrane de PVDF. La détection a été conduite avec un anticorps anti-pERK et anti-ERKt, et révélée à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. La révélation a été faite à l'aide d'ECL+. Immunobuvardage représentatif de 3 extractions protéiques.



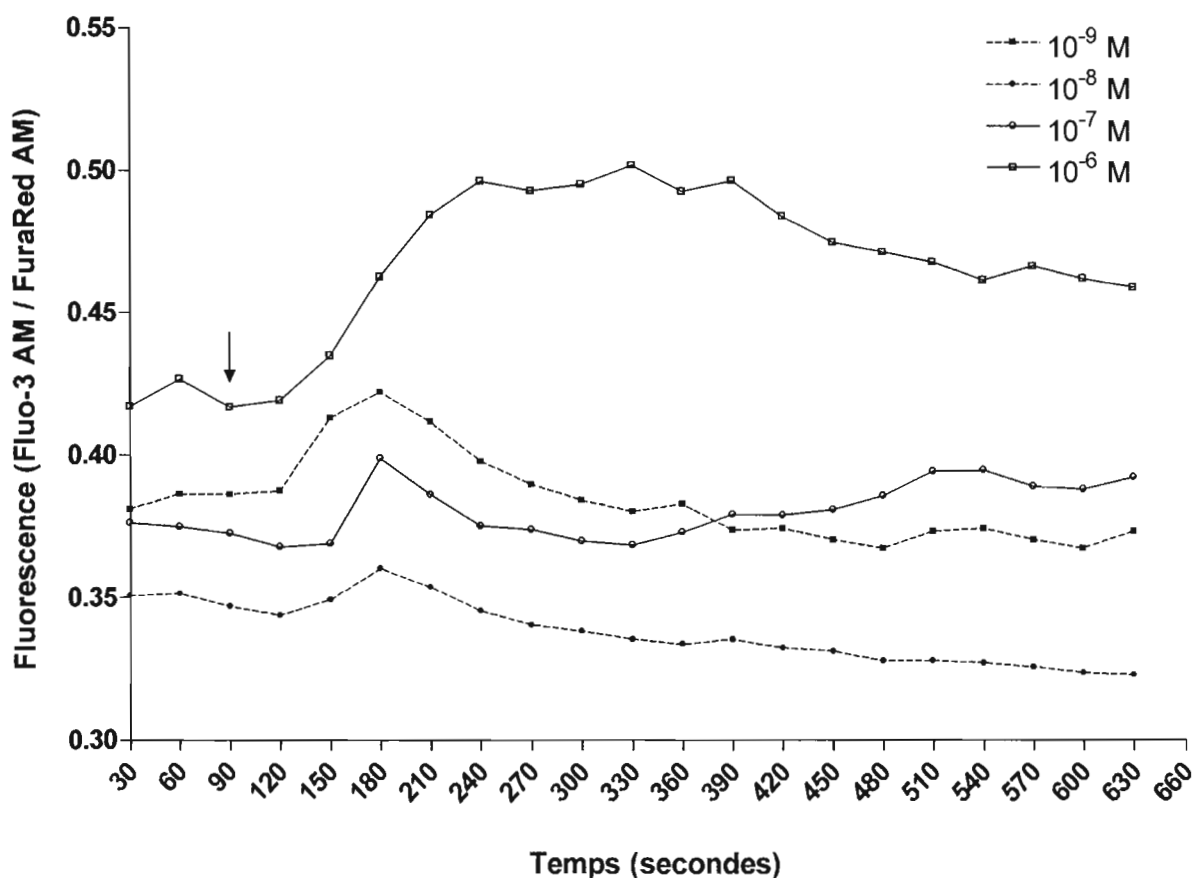
**Figure 3.5 b) : Représentation graphique de l'effet de l'estradiol sur l'activation de la voie ERK/MAPK des MG-63**

Densité relative de la protéine pERK par rapport à la protéine ERKt. La légende est la même que celle présentée à la Figure 3.5 a). Le test statistique réalisé est un test t de Student ( $n = 3$ ; moyennes  $\pm$  SEM). \* signifie qu'il existe une différence significative avec la condition Contrôle.



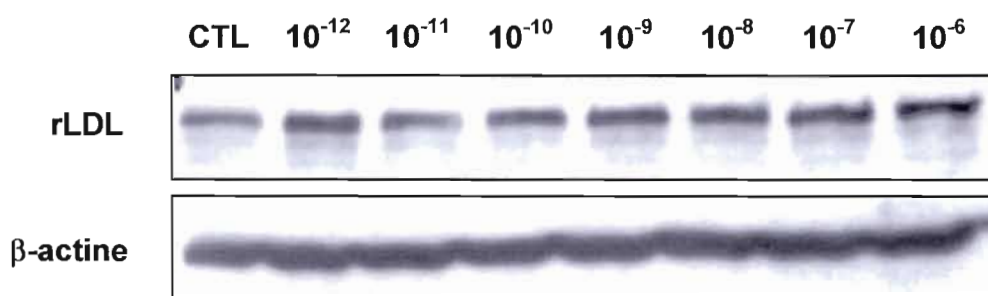
**Figure 3.6 a) : Effet de l'estradiol sur le relargage de calcium par le réticulum endoplasmique dans les cellules MG-63**

À 70% de confluence, les cellules ont été mises en présence du milieu HBSS contenant 2 µM des indicateurs fluorescents Fluo-3 AM et Fura-Red AM ainsi que du Pluronic F127 20% puis incubées pendant 45 minutes à 37°C dans la noirceur. La dé-estérification des indicateurs a été effectuée avec une incubation dans le milieu HBSS pendant 45 minutes à température pièce dans le noir. Immédiatement avant le début de la lecture, les cellules ont été mises en présence de HBSS sans CaCl<sub>2</sub> puis l'ajout de 0.5 x 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-9</sup> et 10<sup>-6</sup> M d'E<sub>2</sub> ou 5 µM de Thapsigargin a été effectué à température pièce au bout d'1 minute 30 (↓). L'enregistrement des flux calciques a été réalisé à l'aide d'un microscope confocal; une longueur d'onde de 488 nm a été utilisée pour l'excitation et l'émission a été enregistrée à 515 et 605 nm.



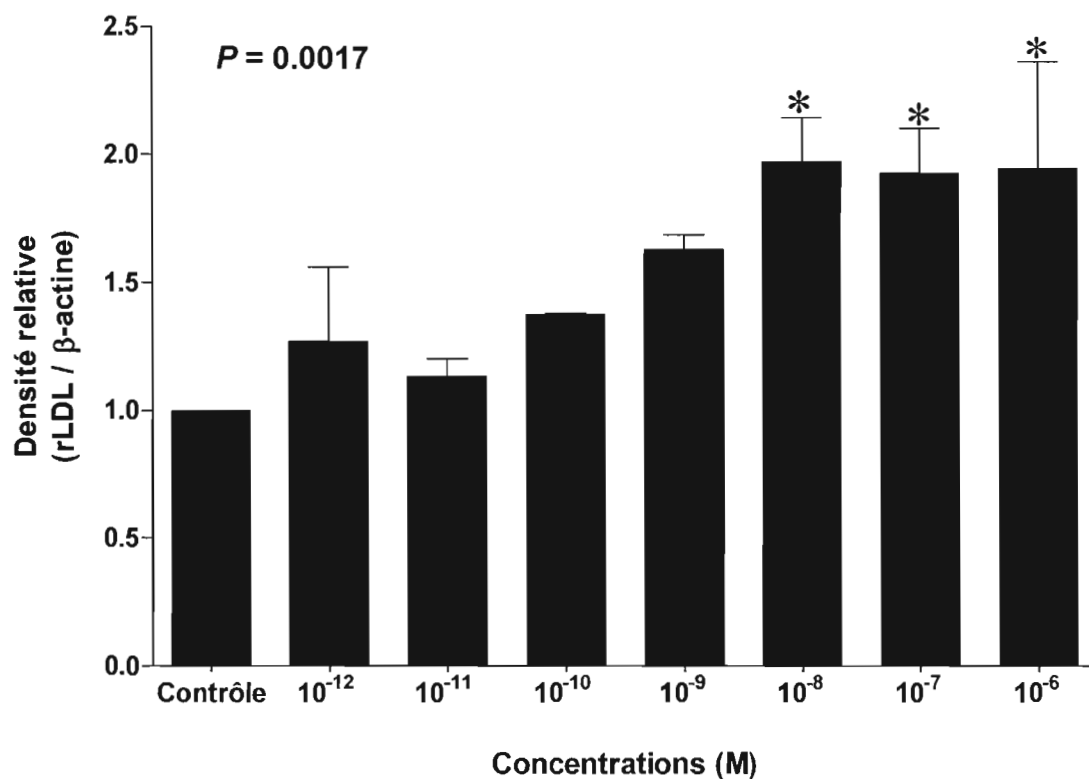
**Figure 3.6 b) : Effet de l'estradiol sur l'entrée de calcium dans les cellules MG-63**

À 70% de confluence, les cellules ont été mises en présence du milieu HBSS contenant 2  $\mu$ M des indicateurs fluorescents Fluo-3 AM et Fura-Red AM ainsi que du Pluronic F127 20% puis incubées pendant 45 minutes à 37°C dans la noirceur. La dé-estérification des indicateurs a été effectuée avec une incubation dans le milieu HBSS pendant 45 minutes à température pièce dans le noir. Puis l'ajout de 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup> et 10<sup>-6</sup> M d'E<sub>2</sub> a été effectué à température pièce au bout d'1 minute 30 (↓). L'enregistrement des flux calciques a été réalisé à l'aide d'un microscope confocal; une longueur d'onde de 488 nm a été utilisée pour l'excitation et l'émission a été enregistrée à 515 et 605 nm.



**Figure 3.7 a) : Effets de traitements à l'estradiol sur l'expression de la protéine rLDL de cellules MG-63 lorsque traitées à confluence**

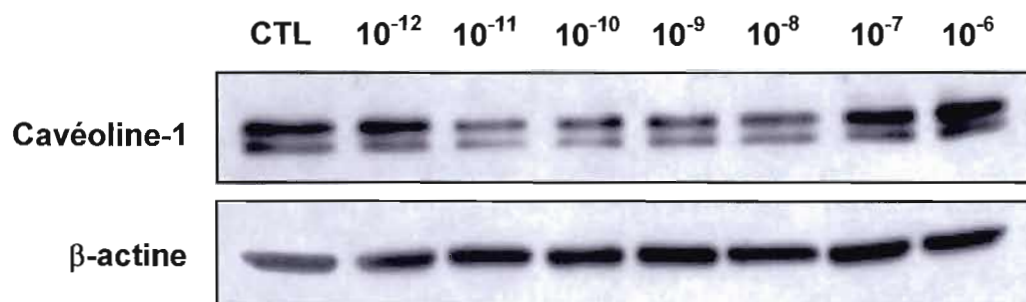
À 90-100% de confluence, les cellules ont été sevrées pendant 24 heures puis traitées avec  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M d'E<sub>2</sub> pendant 24 heures. La condition contrôle (CTL) correspond à des cellules non traitées. À la fin de la durée des traitements, les cellules ont été solubilisées avec un tampon de lyse puis les protéines (100 µg) ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel 8% en conditions réductrices et transférées sur membrane de PVDF. La détection a été conduite avec un anticorps anti-rLDL et anti-β-actine, et révélée à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. La révélation a été faite à l'aide d'ECL+. Immunobuvardage représentatif de 3 extractions protéiques.



**Figure 3.7 b) : Représentation graphique des effets de traitements à l'estradiol sur l'expression de la protéine rLDL de cellules MG-63 lorsque traitées à confluence**

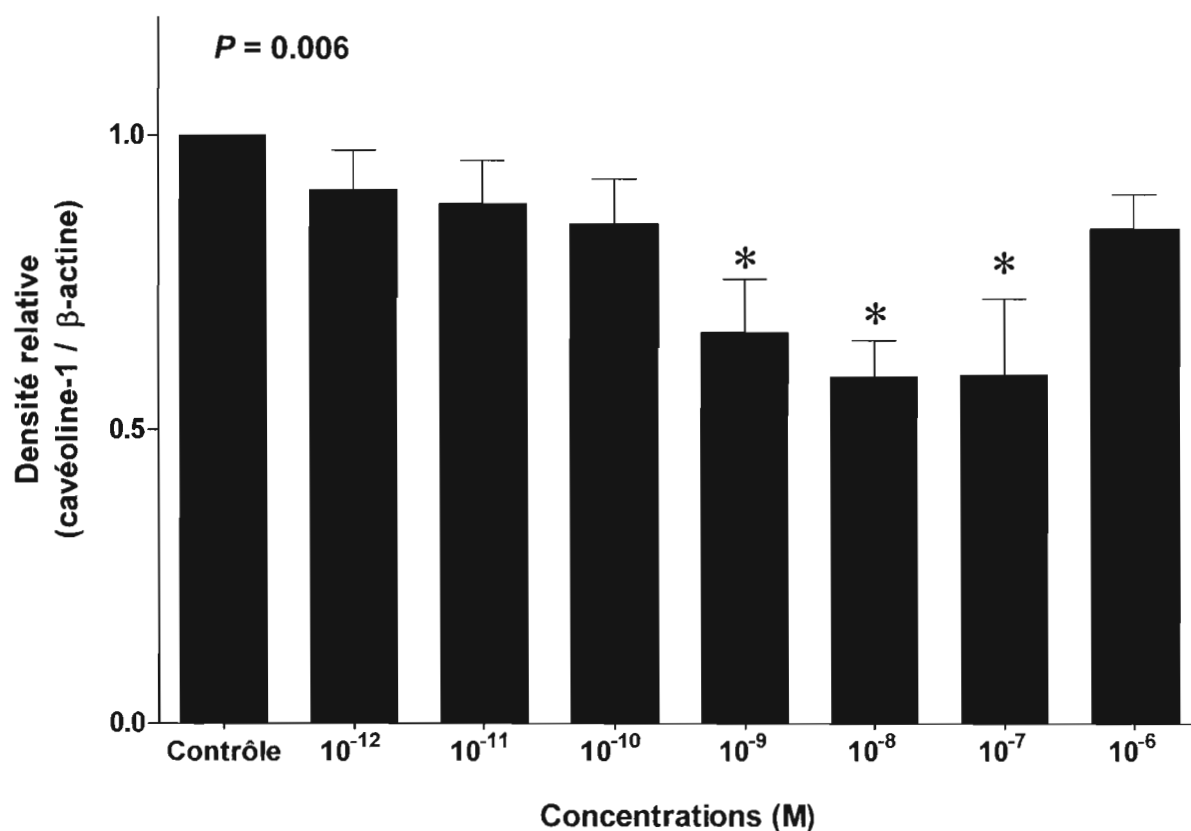
Densité relative de la protéine rLDL par rapport à la protéine β-actine normalisée avec la condition Contrôle. La légende est la même que celle présentée à la Figure 3.8 a). Le test statistique réalisé est une ANOVA ( $n = 3$ ; moyennes  $\pm$  SEM) avec un test de Dunnett (« \* » représente  $P < 0.01$  pour les cellules traitées vs la condition Contrôle).





**Figure 3.8 a) : Effets de traitements à l'estradiol sur l'expression de la protéine cavéoline-1 de cellules MG-63 lorsque traitées à confluence**

À 90-100% de confluence, les cellules ont été sevrées pendant 24 heures puis traitées avec  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M d'E<sub>2</sub> pendant 24 heures. La condition contrôle (CTL) correspond à des cellules non traitées. À la fin de la durée des traitements, les cellules ont été solubilisées avec un tampon de lyse puis les protéines (20  $\mu$ g) ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel 12% en conditions réductrices et transférées sur membrane de PVDF. La détection a été conduite avec un anticorps anti-cavéoline-1 et anti- $\beta$ -actine, et révélée à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. La révélation a été faite à l'aide d'ECL+. Immunobuvardage représentatif de 5 extractions protéiques.



**Figure 3.8 b) : Représentation graphique des effets de traitements à l'estradiol sur l'expression de la protéine cavéoline-1 de cellules MG-63 lorsque traitées à confluence**

Densité relative de la protéine cavéoline-1 par rapport à la protéine β-actine normalisée avec la condition Contrôle. La légende est la même que celle présentée à la Figure 3.9 a). Le test statistique réalisé est une ANOVA ( $n = 5$ ; moyennes  $\pm$  SEM) avec un test de Dunnett (« \* » représente  $P < 0.01$  pour les cellules traitées vs la condition Contrôle).

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

#### 4.1 Expression des ERs dans les cellule MG-63

Les premières expériences réalisées dans le cadre de cette maîtrise ont permis de caractériser la présence des différents variants et isoformes des récepteurs œstrogéniques  $\alpha$  et  $\beta$ .

Au niveau de l'ARNm, les variants  $ER\alpha$  identifiés correspondent à  $ER\alpha$ WT (variant de type sauvage) et à  $ER\alpha\Delta 5$  (variant avec délétion de l'exon 5); et les variants  $ER\beta$  visualisés coïncident avec  $ER\beta$ WT (variant de type sauvage),  $ER\beta 2spl\Delta 5$  (variant avec épissage de type 2 et délétion de l'exon 5) et  $ER\beta\Delta 5-6$  (variant avec délétion des exons 5 et 6). En ce qui concerne l'expression protéique d'ERs retrouvées dans les MG-63, les isoformes  $ER\alpha$ WT,  $ER\alpha\Delta 5$ ,  $ER\beta 2spl\Delta 5$  et  $ER\beta\Delta 5-6$ , s'apparentant par leur poids moléculaire aux variants d'ARNm, ont été détectées par immunobuvardage.

##### 4.1.1 $ER\alpha$

La forme sauvage du récepteur œstrogénique  $\alpha$  ( $ER\alpha$ WT), retrouvée dans les MG-63 au niveau du messenger et de la protéine (Figures 3.1 a) et 3.2 a)), possède un poids attendu entre 66 et 70 kDa [Pavao & Traish 2001] et correspond au récepteur de longueur entière, composé de tous les domaines fonctionnels (Figure 1.4) permettant ainsi l'intégration d'une réponse aux œstrogènes.

L'autre récepteur retrouvé dans les lignées cellulaires MG-63 et MCF-7 est le variant/isoforme ER $\alpha$  $\Delta$ 5 (Figures 3.1 a) et 3.2 a)). D'après Herynk & Fuqua [2004], la délétion de l'exon 5 amène l'introduction d'un codon *stop* dans le domaine de liaison au ligand (domaines E et F) et résulte en la production d'une protéine d'environ 40 kDa. Étant donnée l'introduction d'un codon stop dans ce domaine fonctionnel, ce récepteur œstrogénique perd la majorité du domaine de liaison au ligand, mais conserve néanmoins l'activité associée à AF-1 (fonction d'activation indépendante du ligand) ainsi que sa capacité à lier l'ADN. Ainsi, ce récepteur conserve la capacité d'induire une voie génomique indépendante du ligand. Comme décrit dans l'introduction, ce domaine fonctionnel permet les interactions du récepteur avec des facteurs de croissance [Herynk & Fuqua 2004] et il semble que ces interactions avec AF-1 soient critiques pour les voies de signalisation dans les cellules mammaliennes [Chaidarun & Alexander 1998]. Il a été démontré que l'isoforme ER $\alpha$  $\Delta$ 5 peut augmenter nettement les effets transcriptionnels de ER $\alpha$ WT sur les gènes répondant à l'estradiol dans la lignée ostéoblastique humaine U2OS. De plus, la seule expression de ER $\alpha$  $\Delta$ 5 dans ces mêmes cellules entraîne une augmentation des taux de croissance cellulaire et cela indépendamment de la présence d'E<sub>2</sub> [Chaidarun & Alexander 1998].

La troisième protéine, retrouvée uniquement dans la lignée MCF-7 (Figure 3.2 a)), semble s'apparenter à l'isoforme  $\Delta$ 1a-ER $\alpha$ -46. Cette dernière résulte d'événements d'épissage alternatif impliquant deux codons *start* situés dans l'exon 2, et ainsi l'exon 1 n'est pas transcrit, ayant pour résultat une protéine n'exprimant pas le domaine AF-1 [Denger *et al.* 2001]. Le poids moléculaire attendu pour cette protéine se situe aux alentours de 46 kDa, d'où sa nomenclature, et elle a déjà été caractérisée dans les cellules MCF-7 ainsi que dans des cultures primaires d'ostéoblastes [Denger *et al.* 2001;

Figtree *et al.* 2003]. Un fait intéressant, mais qui ne concorde pas avec les résultats retrouvés ici, est que cette utilisation de l'épissage alternatif dans l'exon 2 semble être prédominant dans les ostéoblastes, entre autres, où  $ER\alpha$  est moins abondant [Herynk & Fuqua 2004].

Bien que le récepteur  $\Delta 1a-ER\alpha-46$  ne possède pas la capacité d'induire des réponses génomiques suite à une activation indépendante du ligand, il a cependant été montré que cette protéine pouvait former des homodimères ainsi que des hétérodimères avec  $ER\alpha WT$  ainsi qu'avec  $ER\beta WT$  dans des cultures primaires d'ostéoblastes [Denger *et al.* 2001]. L'isoforme  $\Delta 1a-ER\alpha-46$  peut donc former des complexes stables de liaison à l'ADN et ainsi entraîner des voies génomiques classiques (dépendantes du ligand) de régulation transcriptionnelle. De plus, Denger et ses collaborateurs [2001] ont aussi montré que, dans une lignée cellulaire ostéoblastique, le récepteur  $\Delta 1a-ER\alpha-46$ , lorsque mis en présence du récepteur  $ER\alpha WT$ , agissait comme inhibiteur potentiel de la transactivation induite par ce dernier et ce, selon un mode d'action dose dépendante. De même, des travaux effectués sur deux lignées de cellules endothéliales humaines, l'une permettant des réponses œstrogéniques de nature génomique et non génomique et l'autre dans laquelle les œstrogènes n'induisaient qu'une signalisation cellulaire rapide, ont permis de supposer que  $ER\alpha WT$  agit autant au niveau génomique que non génomique tandis que  $\Delta 1a-ER\alpha-46$  ne permet que des réponses non génomiques [Russell *et al.* 2000].

#### 4.1.2 $ER\beta$

L'isoforme sauvage du récepteur  $\beta$  ( $ER\beta WT$ ), tout comme  $ER\alpha WT$ , contient tous les domaines fonctionnels nécessaires à une réponse aux œstrogènes. Le poids moléculaire attendu pour cette protéine se situe entre

58 et 62 kDa [Pavao & Traish 2001]. Les résultats obtenus ont montré que le récepteur ER $\beta$ WT est présent au niveau de l'ARNm dans les cellules MG-63 (Figure 3.1 b)) mais que la détection protéique dans cette même lignée ainsi que dans les cellules Caco-2 n'a pas été possible quelque soit l'anticorps primaire utilisé (Figure 3.2 b)). Ce résultat obtenu dans les cellules MG-63 ne correspond pas à ce qui a été retrouvé dans la littérature puisqu'une équipe a montré que les MG-63 exprimaient les deux types de récepteurs œstrogéniques [Cao *et al.* 2003]. Cependant, en contradiction avec les résultats présentés par ce groupe ou une partie des résultats montrés ici, Poola et ses collaborateurs [2002] n'ont détecté aucun des ERs de type sauvage dans une culture primaire d'ostéoblastes humains.

Ainsi bien que deux types d'anticorps primaires aient été utilisés pour la détection de ER $\beta$  dans les cellules MG-63, il n'a pas été possible de caractériser l'expression du type sauvage au niveau protéique. Une des raisons pouvant expliquer ce fait est qu'il a été rapporté que l'anticorps provenant de la compagnie *Santa Cruz* semble être efficace pour détecter la protéine ER $\beta$  recombinante ou surexprimée dans des lignées cellulaires transfectées; cependant, son utilité dans la détection de ER $\beta$ WT exprimé de façon endogène dans des cellules humaines n'a pas encore été confirmée [Pavao & Traish 2001]. De plus, il est aussi possible de supposer que la protéine ne soit pas produite même si son transcrit d'ARNm est présent. Cette possibilité a déjà été rapportée par la littérature en ce qui concerne le ER $\alpha$ WT dans une lignée humaine de cellules endothéliales [Figtree *et al.* 2003; Russell *et al.* 2000].

Le transcrit s'apparentant au récepteur ER $\beta$ 2spl $\Delta$ 5 (Figure 3.1 b)) devrait résulter en une protéine possédant un poids moléculaire d'environ 34 kDa [Lewandowski *et al.* 2002]. Seul l'anticorps primaire provenant de la

compagnie *Santa Cruz* a permis de la détecter dans les cellules MG-63 (Figure 3.2 b) A.). La délétion de l'exon 5 résulte en un déphasage entraînant l'arrêt de la traduction de 5 acides aminés après la bordure de l'exon 4/5 [Lewandowski *et al.* 2002]. Ainsi, la présence d'un codon stop lors de la traduction permet d'expliquer pourquoi la protéine possède un poids moléculaire plus petit qu'attendu d'après le nombre de paires de bases contenu dans son transcrit d'ARNm. Lewandowski et ses collaborateurs [2002] ont aussi montré que la protéine résultante ne possède donc pas la majorité du domaine de liaison au ligand ainsi que le domaine AF-2 (domaine de transactivation dépendante du ligand). Ainsi, la protéine codée par ce transcrit ne répond pas au ligand, ne lie pas ou très faiblement l'ADN et présente une activité dominante négative dose dépendante sur l'action de ER $\alpha$ , préférentiellement [Herynk & Fuqua 2004]. Dans le même ordre d'idées, il a été montré, dans une lignée épithéliale humaine transfectée avec ce variant, que celui-ci possédait des effets inhibiteurs dose dépendants sur la transactivation transcriptionnelle stimulée par E<sub>2</sub> des récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  de type sauvage [Inoue *et al.* 2000].

Un autre variant de ER $\beta$  retrouvé au niveau de l'ARNm des cellules MG-63 et dont l'isoforme protéique a aussi été détectée dans cette même lignée ainsi que dans les cellules Caco-2 est le récepteur ER $\beta\Delta 5-6$  (Figures 3.1 b) et 3.2 b)). La protéine correspondant à ce récepteur possède un poids moléculaire attendu de 49 kDa [Lewandowski *et al.* 2002]. La délétion des exons 5 et 6 entraîne la production d'une protéine qui ne possède pas une partie du domaine de liaison au ligand permettant de suggérer qu'elle possède une affinité de liaison plus faible [Poola *et al.* 2002]. Cependant, bien que cette protéine ne possède plus la capacité d'être activée après liaison à son ligand, elle pourrait néanmoins se translocaliser au noyau, lier des EREs et moduler les propriétés de transactivation du récepteur de type

sauvage en se liant à des co-répresseurs ou des co-activateurs [Poola *et al.* 2002].

## 4.2 Effet de l'estradiol sur la prolifération des cellules MG-63

Les œstrogènes sont des hormones reconnues pour posséder des effets pléiotropiques avec une variété d'actions autant dans les tissus reproducteurs que non reproducteurs [Stossi *et al.* 2004]. En suivant la synthèse d'ADN grâce à l'incorporation de thymidine tritiée [Cheng *et al.* 2002; Luo & Liao 2003] ou en vérifiant l'activation de la voie ERK/MAPK [Endoh *et al.* 1997; Kousteni *et al.* 2001], quelques études ont permis de montrer que les œstrogènes stimulaient la prolifération de cellules ostéoblastiques..

Afin de vérifier uniquement l'effet de l'estradiol sur la prolifération des cellules MG-63, les traitements ont été effectués dans un milieu sans phénol et le FBS utilisé a été filtré sur du charbon afin d'y retirer tous les composants pouvant posséder des effets œstrogéniques.

### 4.2.1 Essais MTT

Pour vérifier si les traitements à l'estradiol conduisaient à une prolifération cellulaire des MG-63, des essais MTT ont tout d'abord été réalisés. Les résultats présentés à la Figure 3.4 montrent que les différentes concentrations d'E<sub>2</sub> utilisées ( $10^{-12}$  à  $10^{-6}$  M) n'ont pas entraîné une augmentation du nombre de cellules viables, par rapport à la condition Contrôle, et ce quelle que soit la durée des traitements (24, 48 ou 72 heures). Ce résultat est en contradiction avec ce qui a été retrouvé dans la littérature puisque Luo & Liao [2003] ont montré que l'estradiol amenait une prolifération des cellules MG-63 et que cet effet prolifératif était transmis par les ERs. De



plus, il a aussi été reporté, dans une autre lignée cellulaire ostéoblastique (TE85) ainsi que dans des cultures primaires d'ostéoblastes humains, que l'effet prolifératif de l'estradiol était atteint entre  $10^{-8}$  et  $10^{-7}$  M après 18 heures de traitement [Cheng *et al.* 2002]. Assez étrangement puisque ne reflétant pas les résultats rapportés par les deux études mentionnées ci-dessus mais confortant les résultats de la présente étude, Cao *et al.* [2003] ont montré que 10 nM ( $10^{-8}$  M) d'estradiol n'entraînait aucune prolifération cellulaire des MG-63 après 14 jours de culture. De plus, dans une autre étude effectuée sur la lignée ostéoblastique humaine SaOS-2, il a été trouvé que l'exposition des cellules à l'estradiol de façon intermittente, mais non continue, avait pour effet de stimuler la croissance cellulaire [Rao *et al.* 2003].

#### 4.2.2 Voie ERK/MAPK

Une des actions non génomiques assez bien connue des œstrogènes est l'activation de la voie MAPK dans une variété de types cellulaires, comprenant les cellules osseuses, endothéliales et neuronales [Kousteni *et al.* 2003]. La protéine MAPK est une kinase sérine/thréonine localisée en aval de cascades signalétiques déclenchées par plusieurs facteurs de croissance et est essentielle à l'activation de la prolifération, la différenciation ou la survie cellulaires [Endoh *et al.* 1997; Kousteni *et al.* 2003]. L'une des trois sous-familles les mieux caractérisées de MAPK est ERK dont la phosphorylation permet l'activation de cette voie de signalisation cellulaire. Endoh et collègues [1997] ont trouvé que des concentrations d'estradiol comprises entre 1 pM et 10 nM ( $10^{-12}$  –  $10^{-8}$  M) induisaient la phosphorylation de la protéine ERK d'une lignée ostéoblastique de rat avec un maximum d'activation atteint en 5 minutes. De plus, il a aussi été démontré que 10 nM d'estradiol entraînait la phosphorylation rapide de ERK (maximum à 5 minutes) dans une culture primaire d'ostéoblastes de souris et que l'activation de cette voie de signalisation atténuait l'apoptose cellulaire [Kousteni *et al.*

2001]. Encore une fois les résultats présentés par la littérature ne reflètent pas ceux obtenus dans le présent mémoire (Figures 3.5 a) et b)) puisqu'aucune augmentation de la phosphorylation de la protéine ERK n'a pu être démontrée dans les cellules MG-63, et ce quelle que soit la concentration d'estradiol testée ( $10^{-12}$  ou  $10^{-6}$  M) ou la durée d'incubation des cellules (5, 10, 20, 30 ou 60 minutes). Il aurait cependant été intéressant de vérifier si les traitements utilisés avaient un effet sur l'activation de la voie ERK/MAPK dans la lignée MCF-7 qui représente un contrôle positif puisqu'il a été montré que l'estradiol induit la prolifération et l'activation de la voie ERK/MAPK dans ce type cellulaire [Dupont & Le Roith 2001; Migliaccio *et al.* 2003; Zivadinovic & Watson 2005].

L'absence de prolifération observée après traitements des cellules MG-63 à l'estradiol pourrait peut-être s'expliquer par le fait que les cellules expriment les deux types de récepteurs œstrogéniques. En effet, plusieurs équipes ont rapporté la suppression de la croissance par ER $\beta$  dans des cellules cancéreuses mammaires [Chang *et al.* 2006]. Il a aussi été montré que la seule expression de ER $\beta$  dans les MCF-7 réduit le taux de croissance basal et qu'un traitement avec des concentrations physiologiques d'E $_2$  dans les cellules MCF-7 exprimant ER $\alpha$  et ER $\beta$  entraînait un taux de prolifération inférieur à celui observé lors d'un traitement œstrogénique sur les cellules n'exprimant que ER $\alpha$  [Chang *et al.* 2006].

Tel que mentionné précédemment, plusieurs études ont cependant montré une augmentation de la prolifération cellulaire ostéoblastique lorsque des traitements œstrogéniques étaient effectués. En lien avec cette prolifération cellulaire induite par l'E $_2$ , quelques chercheurs se sont donc intéressés à l'effet de cette hormone sur l'apoptose cellulaire. Ainsi, il a été rapporté que l'E $_2$  réduisait l'apoptose de cellules ostéoblastiques murines

après 5 jours de culture alors que l'androgène, autre stéroïde sexuel, augmentait cette mort cellulaire programmée par élévation du ratio Bax/Bcl-2 [Wiren *et al.* 2006]. De façon assez intéressante, Chandar *et al.* [2004] ont montré, dans une lignée cellulaire ostéoblastique de rat, que l'estradiol induisait une augmentation de l'expression de p53, protéine impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée des cellules en apoptose. Cependant, bien que l'estradiol ait augmenté l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, aucune mort des cellules n'a pu être observée ce qui suggère que p53 possède un rôle important dans la différenciation des ostéoblastes [Chandar *et al.* 2004]. Il a aussi été trouvé que l'estradiol nécessite l'activation de ERK pour induire les signaux anti- et pro-apoptotiques dans les ostéocytes et les ostéoclastes, respectivement, et ces différentes actions semblent pouvoir être expliquées par des différences dans la durée de phosphorylation de ERK et de son accumulation dans le noyau [Chen *et al.* 2005].

### 4.3 Entrée intracellulaire de calcium

La concentration calcique rencontrée dans les milieux extracellulaires est essentielle à un certain nombre de processus vitaux allant de la formation osseuse à la coagulation sanguine. Au niveau du métabolisme osseux, une augmentation de la concentration de calcium extracellulaire altère la morphologie des ostéoclastes et inhibe la résorption osseuse tandis que pour les ostéoblastes, cette augmentation induit la prolifération et la formation osseuse [Riccardi 2000]. De plus, tel que mentionné précédemment, parmi les actions non génomiques que possèdent les œstrogènes, les influx calciques sont une des voies de signalisation rapportée par la littérature comme étant induite par l'estradiol [Kelly & Levin 2001].

En accord avec la littérature, nous avons montré qu'une concentration d'E<sub>2</sub> égale à 10<sup>-6</sup> M augmente la concentration intracellulaire d'ions calciques dans les cellules MG-63 (Figure 3.6 b)). Ces résultats suggèrent que l'estradiol induit une entrée d'ions calciques à partir du milieu extracellulaire, puisqu'aucune augmentation de la concentration de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire n'a pu être notée en absence de calcium extracellulaire. Ainsi, l'E<sub>2</sub> n'induit pas de relargage calcique par le réticulum endoplasmique dans les cellules MG-63 (Figure 3.6 a)).

Quelques études ont montré que l'estradiol induit une augmentation rapide du niveau intracellulaire d'ions calcium dans les ostéoblastes. Ainsi, Chen *et al.* [2001] ont trouvé que des concentrations de 5 et 10 µM d'estradiol conduisaient à une élévation immédiate de la concentration intracellulaire calcique de cellules MG-63 lorsque traitées dans un milieu contenant du calcium. Ce résultat leur a permis de suggérer que cette action ne pouvait être associée au modèle de régulation génomique des ERs. Avec les résultats présentés dans ce mémoire, nous avons pu induire un influx calcique avec une concentration inférieure à celle utilisée dans l'étude de Chen *et al.* [2001]. Cependant, pour pouvoir confirmer que l'interaction de l'estradiol avec ERs est nécessaire à l'induction d'un influx de calcium à partir du milieu extracellulaire dans la lignée cellulaire MG-63, il aurait été intéressant de vérifier l'effet d'antagonistes (ces molécules se lient aux ERs, préviennent la liaison de E<sub>2</sub> mais n'induisent aucun effet associé à l'hormone), tel que ICI 182780 [Wakeling 2000], lors de mesures calciques. Aussi, tel que suggéré par Wu *et al.* [2005], l'utilisation d'un conjugué imperméable à la membrane cytoplasmique, comme le E<sub>2</sub>-FITC-BSA, aurait pu confirmer un effet purement non génomique de l'estradiol, suggérant que seule la liaison de l'E<sub>2</sub> avec son récepteur situé à la membrane

cytoplasmique entraîne une élévation de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules MG-63.

De plus, Chen et ses collaborateurs [2001] ont aussi démontré que cette augmentation était dose dépendante avec une élévation initiale des niveaux calciques plus rapide et l'observation d'un plateau soutenu lors de l'ajout de 10  $\mu\text{M}$  d' $\text{E}_2$  en comparaison avec 5  $\mu\text{M}$  d'estradiol. Néanmoins, étant donné que l'expérience décrite par ces auteurs a été effectuée dans un milieu calcique, il est impossible de savoir si l'augmentation calcique intracellulaire observée provient d'un relargage d'ions par le réticulum endoplasmique suivi d'une entrée capacitative ou bien uniquement d'une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du milieu extracellulaire sans induction de relargage.

En plus de montrer que l'estradiol entraînait une augmentation transitoire du niveau intracellulaire de calcium dans des cultures primaires d'ostéoblastes humains, un autre groupe de chercheurs a aussi vérifié quelles proportions de cette hausse du niveau calcique intracellulaire étaient dues à un influx calcique provenant du milieu extracellulaire et à la mobilisation d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum endoplasmique [Sömjen *et al.* 1997]. Ainsi, à l'aide de différents inhibiteurs, ils ont démontré que l'augmentation cytosolique de la concentration calcique se faisait selon deux mécanismes; le premier reflète un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du milieu extracellulaire à travers des canaux calciques voltage dépendant, et le second indique un relargage de calcium par le réticulum endoplasmique impliquant l'activation de la phospholipase C et la génération d' $\text{IP}_3$  [Sömjen *et al.* 1997]. Il aurait été judicieux de déterminer quels étaient les canaux calciques activés par  $\text{E}_2$  dans les cellules MG-63 en utilisant des inhibiteurs. En effet, la nature de la voie d'entrée d'ions calciques reste encore très controversée, impliquant des canaux calciques voltage dépendants et indépendants ainsi que des canaux

ioniques non sélectifs [Perret *et al.* 2001], et il est à prévoir que les mécanismes associés à cette augmentation des niveaux intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  diffèrent d'un type cellulaire à un autre.

#### 4.4 Modulation de l'expression protéique par l'estradiol

Lorsque les cellules MG-63 ont été traitées avec différentes concentrations d'estradiol pendant 24 heures à sous confluence, aucune modulation de l'expression de la protéine cavéoline-1 n'a pu être observée, tel que présenté aux Figures 3.3 a) et b). Cependant, pour le même type cellulaire à confluence, les différentes concentrations d'E<sub>2</sub> utilisées ont permis de montrer une régulation de l'expression des protéines rLDL (Figures 3.7 a) et b)) et cavéoline-1 (Figures 3.8 a) et b)).

##### 4.4.1 Cavéoline-1 à sous confluence

Le premier essai de modulation protéique par différentes concentrations d'estradiol a été effectué sur la cavéoline-1 lorsque les cellules MG-63 se trouvaient en situation de sous confluence. Les cavéoles, dont la protéine cavéoline-1 est la protéine structurale majeure, sont désormais reconnues comme étant des invaginations dans lesquelles un nombre important de voies de signalisation cellulaire sont intégrées due à la présence de différents types de molécules transductionnelles [Razani *et al.* 2002; Solomon *et al.* 2000b]. Cette densité de culture cellulaire a été choisie du fait que quelques articles retrouvés dans la littérature annonçaient une élévation de l'expression des récepteurs œstrogéniques lorsque les cellules étaient en condition de prolifération [Brooks *et al.* 1984; Faye *et al.* 1989; Ikegami *et al.* 1994]. Cependant, il n'a pas été possible de montrer un quelconque effet d'E<sub>2</sub> sur la modulation protéique de la cavéoline-1 des cellules MG-63 à sous confluence bien que nous avons supposé qu'un tel effet aurait pu s'avérer

important considérant une plus forte expression des ERs dans une condition de culture à sous confluence.

#### 4.4.2 rLDL

Afin de vérifier si les cellules MG-63 possédaient la capacité à répondre à une modulation protéique par les œstrogènes, nous avons vérifié si l'expression du rLDL pouvait être régulée par l'E<sub>2</sub>. En accord avec la littérature, les traitements des cellules MG-63 avec différentes concentrations d'estradiol ont amené une augmentation de l'expression protéique du rLDL avec un maximum significatif atteint pour une concentration de 10<sup>-8</sup> M d'E<sub>2</sub>.

Cette modulation protéique par les œstrogènes a pu être observée dans des cellules placentaires [Shanker *et al.* 1998] pour lesquelles de faibles concentrations d'E<sub>2</sub> augmentaient le message de rLDL tandis que de plus fortes concentrations avaient pour effet de diminuer les niveaux d'ARNm de rLDL. Dans une lignée de cellules épithéliales de rats, Smith *et al.* [2004] ont montré que l'estradiol augmentait les niveaux d'ARNm et protéiques du rLDL et élevait l'endocytose des LDL. En utilisant un modèle *in vivo* (rats femelles non ovariectomisées), il a aussi été possible de montrer que, dépendamment du mode d'administration de l'estradiol (oral, subcutané ou par pompes osmotiques), différentes doses pharmacologiques de l'hormone diminuaient les niveaux plasmatiques totaux de cholestérol tout en augmentant les niveaux d'ARNm hépatiques du rLDL [Parini *et al.* 2000]. De plus, en utilisant des lignées cellulaires humaines HepG2 exprimant l'un ou l'autre des récepteurs œstrogéniques, Brüning et ses collaborateurs [2003] ont permis de montrer que l'estradiol stimule l'expression du gène de rLDL à travers ER $\alpha$  uniquement, et ce, selon un mode d'action génomique indépendante des EREs.

Les résultats présentés ici confortent donc la littérature et montrent pour la première fois que le rLDL est régulé à la hausse, et ce de manière dose dépendante, par l'estradiol dans les cellules ostéoblastiques MG-63. Il a été rapporté dans la littérature que la région du promoteur du rLDL responsable de la réponse œstrogénique est localisée dans un élément de réponse aux stéroïdes [Croston *et al.* 1997]. Il serait donc intéressant d'approfondir cette voie d'investigation pour permettre d'éclaircir les mécanismes de modulation protéique dans le modèle d'ostéoblastes MG-63. Il est possible de se demander si la régulation de l'expression du rLDL dans les cellules MG-63 aurait été la même à sous confluence.

#### 4.4.3 Cavéoline-1 à confluence

Puisqu'il a été possible d'observer que l'estradiol modulait l'expression protéique du rLDL dans les MG-63, nous avons décidé de reprendre les traitements pour vérifier un effet possible sur la cavéoline-1 mais cette fois lorsque les cellules se trouvaient à confluence. En effectuant les traitements dans ces nouvelles conditions, il a été possible d'observer une régulation de l'E<sub>2</sub> sur l'expression de la cavéoline-1. La modulation de l'expression de la protéine cavéoline-1 par l'estradiol semble s'apparenter à un schéma biphasique inversé avec un minimum d'expression protéique à 10<sup>-8</sup> et 10<sup>-7</sup> M. Quelques articles rapportent cette modulation hormonale sur la cavéoline-1. Ainsi, Jayachandran *et al.* [2001] ont montré, dans des cellules endothéliales de bovin, que des concentrations de 10<sup>-10</sup> et 10<sup>-8</sup> M d'E<sub>2</sub> augmentaient les niveaux du messenger et protéiques de la cavéoline-1 au bout de 48 heures de traitement. Cependant, bien que cette différence ne soit pas significative, les travaux de ce groupe permettent de constater que l'augmentation observée à 10<sup>-8</sup> M est inférieure à celle obtenue avec 10<sup>-10</sup> M, ce qui peut permettre de supposer que l'utilisation de concentrations plus fortes aurait



peut-être permis l'observation d'une courbe inversement proportionnelle ou bien une cloche inversée.

Dans des études réalisées *in vivo*, plusieurs équipes ont aussi montré que l'estradiol module l'expression de la cavéoline-1. Ainsi, dans des tissus provenant de l'aorte de rats femelles ovariectomisées recevant une dose sous-cutanée d'estradiol pendant 2 semaines, Watanabe et collègues [2004] ont montré, par PCR en temps réel, que le transcrit d'ARNm de la cavéoline-1 était surexprimé par rapport à la condition Contrôle. Turi *et al.* [2001] ont quant à eux observé que, dans le même modèle animal en utilisant sensiblement la même méthodologie, le traitement pendant 24 heures avait pour effet de diminuer le niveau protéique de la cavéoline-1 dans le muscle utérin. De même, Woodman et ses collaborateurs [2004] sont aussi parvenus à la même conclusion après traitement de rats à l'estradiol pendant 7 jours montrant que le niveau protéique de la cavéoline-1 de cellules aortiques était significativement diminué. Lorsque tous ces résultats sont pris ensemble, il apparaît donc que les différents effets observés sur la synthèse protéique de la cavéoline-1 pourraient être attribuables aux différences dans les types cellulaires testés, des modèles utilisés ou bien encore du sexe des individus sur lesquels les traitements ont été effectués.

L'implication des ERs dans cette modulation de l'expression protéique de la cavéoline-1 des cellules MG-63, ainsi que dans la régulation du rLDL, aurait pu être vérifié avec l'utilisation de l'antagoniste spécifique ICI 182780 [Wakeling 2000]. Ainsi, si les effets observés après traitements à l'estradiol avaient été réduits lors de l'utilisation de cette molécule anti-œstrogénique, il aurait été possible de conclure que l'effet des œstrogènes sur l'expression des protéines cavéoline-1 et rLDL dans les cellules MG-63 impliquait la liaison de l'hormone à l'un ou l'autre de ses récepteurs. Comme pour le

rLDL, aucune étude ne rapporte la présence d'un ERE situé dans le promoteur du gène de la cavéoline-1, mais deux séquences s'apparentant à des éléments de réponses aux stéroïdes ont cependant été retrouvées dans le gène de la cavéoline-1 [Bist *et al.* 1997].

Afin de pouvoir déterminer si la régulation observée est induite par une voie génomique ou non génomique des œstrogènes, il aurait été judicieux d'utiliser un composé imperméable à la membrane, tel que le E<sub>2</sub>-BSA. Le traitement des cellules avec cette molécule aurait peut-être permis de montrer si la seule liaison de l'E<sub>2</sub> avec son récepteur, sans que le complexe ER/E<sub>2</sub> ne soit internalisé, suffisait à moduler l'expression protéique. L'utilisation de ce composé reste cependant problématique quant à la capacité de démontrer l'implication d'un ER à la membrane plasmique dans les effets œstrogéniques puisqu'il a été observé que le complexe E<sub>2</sub>-BSA contient des niveaux détectables d'estradiol libre et que ce complexe forme souvent de larges agrégats dont les effets biologiques sont inconnus [Zhu & Smart 2003].

En considérant les résultats obtenus dans le présent travail en ce qui a trait à la régulation de l'expression de la cavéoline-1 des cellules MG-63, et étant donné que seules une ou deux concentrations sont généralement utilisées, dans les expériences des articles retrouvés dans la littérature, il est possible de se demander quels auraient été les patrons de régulation obtenus si plusieurs concentrations hormonales avaient été testées. Ainsi, bien que plusieurs recherches concluent en montrant que l'estradiol régule effectivement l'expression protéique de la cavéoline-1, aucune étude n'a rapporté l'effet de concentrations variables de l'estradiol, ce qui rend difficiles les comparaisons qui auraient pu en être tirées. Cependant, même si la régulation biphasique que nous avons observée semble étonnante puisque

nous nous attendions à observer une augmentation dose dépendante, il n'en reste pas moins que ce mode de réponse biologique est connu en relation avec les mécanismes d'actions de certaines hormones.

Ainsi, dans le type de réponse biphasique, une substance biologiquement active peut stimuler à faibles doses une certaine réponse cellulaire mais inhiber cette réponse cellulaire à fortes doses [Barnard & Gurevich 2005]. Les schémas communs pour une telle réponse cellulaire comprennent une boucle de rétroaction négative; la présence de deux types de récepteurs d'affinités différentes, l'un stimulant la réponse cellulaire, l'autre l'inhibant; la désensibilisation des récepteurs cellulaires; et finalement, des changements dans la conformation des molécules effectrices. De manière assez intéressante, il a déjà été montré que la présence des deux types de ERs entraînait une régulation biphasique de l'estradiol sur l'enzyme oxyde nitrique synthase [Barnard & Gurevich 2005].

L'opposition dans l'activité des deux récepteurs œstrogéniques n'est pas nouvelle. En effet, il a déjà été rapporté que ER $\beta$  s'oppose à la transcription induite par ER $\alpha$ . Ainsi, ER $\beta$  semble agir comme régulateur dominant de la signalisation par les œstrogènes, et lorsque ce récepteur est co-exprimé avec ER $\alpha$ , il entraîne une réduction dose dépendante de l'activité transcriptionnelle induite par ER $\alpha$  [Matthews & Gustafsson 2003]. De plus, une étude a aussi montré que les deux types de récepteurs régulaient de façon sélective différents types de gènes dans la lignée ostéoblastique U2OS transfectée avec ER $\alpha$  et/ou ER $\beta$ , permettant d'observer que parmi les gènes sélectivement régulés, le 3/4 l'étaient par ER $\alpha$  [Stossi *et al.* 2004]. Des différences dans la capacité de l'estradiol à activer l'expression génique selon le type de récepteur œstrogénique ont aussi été rapportées. Ainsi, il a été montré, dans une lignée cellulaire épithéliale de rein transfectée avec l'un ou

l'autre ER, que l'expression d'un gène rapporteur était induite avec une concentration inférieure d'E<sub>2</sub> pour ER $\alpha$  qu'avec ER $\beta$  [Barkhem *et al.* 1998].

Il nous a donc été possible de montrer avec les résultats de ce mémoire que la protéine cavéoline-1 est modulée par E<sub>2</sub> lorsque les cellules MG-63 se trouvent à confluence tandis qu'aucune modulation n'a été observable pour ce même type cellulaire à sous confluence. Il serait donc intéressant de déterminer le niveau d'expression des ERs en fonction de la confluence cellulaire afin d'évaluer s'il existe une corrélation permettant d'expliquer l'absence et la présence d'effets de cette hormone à deux niveaux de confluence. Il n'existe que très peu d'études sur les caractéristiques phénotypiques des cellules MG-63 en relation avec le niveau de confluence cellulaire. Il a cependant été montré que ces cellules sécrètent 2 à 3 plus d'ostéocalcine à sous confluence qu'en situation de confluence; aussi, ces auteurs ont observé que la concentration du récepteur à la vitamine D se trouvait augmenté en condition de sous confluence comparativement à une condition de confluence cellulaire [Lajeunesse *et al.* 1990].

#### 4.4.4 *Signification physiologique de la réduction de l'expression de la cavéoline-1 par l'estradiol*

Tel que mentionné dans l'introduction, l'enzyme eNOS a été localisée dans les cavéoles de cellules épithéliales dans lesquelles elle se trouve en interaction avec la cavéoline-1. Cette conformation protéique la rend inactive mais après activation par des agonistes, tels les œstrogènes, eNOS se dissocie de la cavéoline-1 et se translocalise dans le cytosol où elle se retrouve sous sa formes active [Chambliss & Shaul 2002; Everson & Smart 2001; Michel 1999]. De plus, une étude assez récente conduite par Woodman *et al.* [2004] a montré que des traitements de cellules aortiques de rats avec de l'estradiol diminuaient l'expression de la cavéoline-1 et

augmentaient celle de la calmoduline, sans avoir aucun effet sur l'expression de eNOS. Il a aussi été retrouvé qu'une population de ER $\alpha$  se situait en co-localisation avec eNOS dans les cavéoles de cellules endothéliales et un mécanisme d'action amenant à l'activation de eNOS par les œstrogènes a été proposé. Ainsi, la liaison du ligand au récepteur œstrogénique  $\alpha$  active une protéine G (G $_{\alpha_i}$ ) qui induit l'apparition d'événements en aval comprenant l'activation de la voie MAPK ainsi que la perturbation de l'environnement calcique ce qui conduit à l'activation de eNOS dépendante de la calmoduline [Chambliss & Shaul 2002].

Le NO (*oxyde nitrique*) joue un rôle important en tant que médiateur de plusieurs fonctions cellulaires telles que la relaxation vasculaire ou la neurotransmission, dans une variété de types de cellules. Sa production est induite par les enzymes NOS (*oxyde nitrique synthétases*) dont la forme constitutive endothéliale (eNOS) est exprimée dans le tissu osseux [Fox & Chow 1998; Van't Hof & Ralston 2001]. Il a tout d'abord été montré que les œstrogènes stimulaient l'activité de eNOS ainsi que ses niveaux d'ARNm dans les ostéoblastes. Dans le système osseux, il a aussi été montré que des inhibiteurs des NOS abolissaient les effets protecteurs de l'estradiol de rats femelles ovariectomisées alors qu'un donneur de NO était aussi efficace que les œstrogènes à prévenir la perte de masse osseuse induite par l'ovariectomie [Van't Hof & Ralston 2001]. Cependant, les inhibiteurs des NOS sont non spécifiques [Armour *et al.* 2001] et le développement de modèles animaux déficients pour l'une des formes de NOS se révèle d'une grande importance dans la clarification de l'implication des différentes formes enzymatiques dans le rôle protecteur de l'estradiol sur les tissus osseux. Ainsi, plusieurs études récentes rapportent que eNOS est impliqué dans la stimulation osseuse induite par les œstrogènes. En effet, les animaux déficients pour cette enzyme, utilisés lors de ces études, présentaient des

taux de différenciation, de prolifération et de fonction ostéoblastiques anormaux en comparaison avec des animaux exprimant toujours eNOS [Aguirre *et al.* 2001; Armour *et al.* 2001; O'Shaughnessy *et al.* 2000].

Bien que ces différentes études n'aient pas été conduites dans les tissus osseux, elles amènent néanmoins différentes hypothèses découlant de la régulation de l'expression de la cavéoline-1 observée après traitements des cellules MG-63 à l'estradiol. Ainsi, il serait intéressant de poursuivre dans cette voie en allant vérifier tout d'abord si la baisse de l'expression protéique obtenue lors de l'utilisation de concentrations physiologiques amène à la baisse du nombre de cavéoles situées à la membrane plasmique. En second lieu, il serait pertinent d'examiner quelles sont les conséquences de cette baisse d'expression de la cavéoline-1 sur le niveau de production de NO ainsi que l'expression protéique de eNOS. Finalement, il serait intéressant de vérifier si plusieurs types de ERs peuvent se retrouver dans les cavéoles et si leur présence dans ces microdomaines de la membrane plasmique implique une interaction avec la cavéoline-1.

## CHAPITRE V

### CONCLUSION

Avec les travaux présentés dans le cadre de ce mémoire, l'ostéoporose postménopause ne peut être expliquée par une diminution de la prolifération des cellules ostéoblastiques. Il a cependant été possible d'observer que la lignée ostéoblastique humaine MG-63 exprime les deux types de récepteurs œstrogéniques et qu'elles possèdent donc les moyens d'intégrer les réponses hormonales induites par les œstrogènes.

Toutefois, la diminution des œstrogènes à la ménopause se traduirait en une augmentation de l'expression de la cavéoline-1 des cellules ostéoblastiques. Il serait donc pertinent de vérifier si cet effet des œstrogènes sur la diminution de l'expression de la protéine cavéoline-1 avant la ménopause se traduit par une réduction du nombre de cavéoles à la membrane plasmique ainsi qu'une modification de l'activité de eNOS. En effet, cette enzyme est associée aux cavéoles de certains types cellulaires, et son produit, NO, est nécessaire à un métabolisme osseux adéquat.

Avec la perte des œstrogènes associée à la ménopause, il est possible de supposer que l'activité de eNOS soit réduite par l'augmentation de l'expression de la cavéoline-1. Étant donné que l'enzyme eNOS associée à la cavéoline-1 se trouve sous sa forme inactive, l'absence d'œstrogènes dans le milieu extracellulaire aurait pour effet de garder cette conformation inactive supprimant ainsi les effets bénéfiques de NO sur le métabolisme osseux. Ainsi, afin d'approfondir cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier quels pourraient être les effets de concentrations physiologiques d'E<sub>2</sub> sur

l'expression protéique de eNOS, son interaction avec la protéine cavéoline-1 ainsi que sur la production de NO.



## RÉFÉRENCES

- ACCONCIA F., ASCENZI P., BOCEDI A., SPISNI E., TOMASI V., TRENTALANCE A., VISCA P. & MARINO M. 2005. Palmitoylation-dependent estrogen receptor  $\alpha$  membrane localization: regulation by  $17\beta$ -estradiol. *Mol. Biol. Cell* **16**: 231 – 7.
- AGUIRRE J., BUTTERY L., O'SHAUGHNESSY M., AFZAL F., MARTICORENA I.F., HUKKANEN M., HUANG P., MACINTYRE I. & POLAK J. 2001. Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *Am. J. Pathol.* **158**: 247 – 57.
- ANDERSON R.G.W. 1993. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 10909 – 13.
- ARMOUR K.E., ARMOUR K.J., GALLAGHER M.E., GÖDECKE A., HELFRICH M.H., REID D.M. & RALSTON S.H. 2001. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology* **142**: 760 – 6.
- ARVANITIS D.N., WANG H., BAGSHAW R.D., CALLAHAN J.W. & BOGGS J.M. 2004. Membrane-associated estrogen receptor and caveolin-1 are present in central nervous system myelin and oligodendrocyte plasma membranes. *J. Neurosci. Res.* **75**: 603 – 13.
- BARKHEM T., CARLSSON B., NILSSON Y., ENMARK E., GUSTAFSSON J.-A. & NILSSON S. 1998. Differential response of estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$  to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol. Pharmacol.* **54**: 105 – 12.

- BARNARD R. & GUREVICH K.G. 2005. *In vitro* bioassay as a predictor of *in vivo* response. *Theor. Biol. Med. Model.* **2**: 3.
- BARON R. 1993. Anatomy and ultrastructure of bone. *In* Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism; *Editors* Favus M.J. *et al.* Second edition, Raven Press, New York.
- BIST A., FIELDING P.E. & FIELDING C.J. 1997. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 10693 – 8.
- BORD S., BEAVAN S., IRELAND D., HORNER A. & COMPSTON J.E. 2001. Mechanisms by which high-dose estrogen therapy produces anabolic skeletal effects in postmenopausal women: role of locally produced growth factors. *Bone* **29**: 216 – 22.
- BORD S., IRELAND D.C., BEAVAN S.R. & COMPSTON J.E. 2003. The effects of estrogen on ostéoprotégérine, RANKL, and estrogen expression in human osteoblasts. *Bone* **32**: 136 – 41.
- BROOKS S.C., HANSEN E.R., SAUNDERS D.E., BATTELLI M.G. & SHAFIE S.M. 1984. Effect of growth on the estrogen receptor levels in MCF-7 cells. *Cancer Res.* **44**: 3724 – 9.
- BRÜNING J.C., LINGOHR P., GILLETTE J., HANSTEIN B., AVCI H., KRONE W., MÜLLER-WIELAND D. & KOTZKA J. 2003. Estrogen receptor- $\alpha$  and Sp1 interact in the induction of the low density lipoprotein-receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **86**: 113 – 21.
- CANALIS E. 1993. Regulation of bone remodeling. *In* Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism; *Editors* Favus M.J. *et al.* Second edition, Raven Press, New York.

- CAO L., BU R., OAKLEY J.I., KALLA S.E. & BLAIR H.C. 2003. Estrogen receptor- $\beta$  modulates synthesis of bone matrix proteins in human osteoblast-like MG63 cells. *J. Cell. Biochem.* **89**: 152 – 64.
- CHAIDARUN S.S. & ALEXANDER J.M. 1998. A tumor-specific truncated estrogen receptor splice variant enhances estrogen-stimulated gene expression. *Mol. Endocrinol.* **12**: 1355 – 66.
- CHAMBLISS K.L. & SHAUL P.W. 2002. Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in caveolae. *Steroids* **67**: 413 – 9.
- CHAMBLISS K.L., YUHANNA I.S., ANDERSON R.G.W., MENDELSON M.E. & SHAUL P.W. 2002. ER $\beta$  has nongenomic action in caveolae. *Mol. Endocrinol.* **16**: 938 – 46.
- CHANDAR N., LOGAN D., SZAJKOVICS A. & HARMSTON W. 2004. Gene expression changes accompanying p53 activity during estrogen treatment of osteoblasts. *Life Sci.* **75**: 2045 – 55.
- CHANG E.C., FRASOR J., KOMM B. & KATZENELLENBOGEN B.S. 2006. Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Endocrinology* **29**: sous presse.
- CHEN Y.-C., CHEN S.-J., CHANG H.-T., HUANG J.-K., WANG J.-L., TSENG L.-L., CHANG H.-J., SU W., LAW Y.-P., CHEN W.-C. & JAN C.-R. 2001. Mechanisms of diethylstilbestrol-induced calcium movement in MG-63 human osteosarcoma cells. *Toxicol. Lett.* **122**: 245 – 53.
- CHEN J.-R., PLOTKIN L.I., AGUIRRE J.I., HAN L., JILKA R.L., KOUSTENI S., BELLIDO T. & MANOLAGAS S.C. 2005. Transient *versus* sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti- *versus* pro-apoptotic effects of estrogens. *J. Biol. Chem.* **280**: 4632 – 8.

- CHENG M.Z., RAWLINSON S.C., PITSILLIDES A.A., ZAMAN G., MOHAN S., BAYLINK D.J. & LANYON L.E. 2002. Human osteoblasts' proliferative responses to strain and  $17\beta$ -estradiol are mediated by the estrogen receptor and the receptor for insulin-like growth factor I. *J. Bone Miner. Res.* **14**: 593 – 602.
- COMPSTON J.E. 2001. Sex steroids and bone. *Physiol. Rev.* **81**: 419 – 47.
- CONRAD P.A., SMART E.J., YING Y-S., ANDERSON R.G.W. & BLOOM G.S. 1995. Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps. *J. Cell Biol.* **131**: 1421 – 33.
- CROSTON G.E., MILAN L.B., MARSCHKE K.B., REICHMAN M. & BRIGGS M.R. 1997. Androgen receptor-mediated antagonism of estrogen-dependent low density lipoprotein receptor transcription in cultured hepatocytes. *Endocrinology* **138**: 3779 – 86.
- DENGER S., REID G., KOS M., FLOURIOT G., PARSCH D., BRAND H., KORACH K.S., SONNTAG-BUCK V. & GANNON F. 2001. ER $\alpha$  gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol. Endocrinol.* **15**: 2064 – 77.
- DUPONT J. & LE ROITH D. 2001. Insulin-like growth factor 1 and  $\alpha$ -estradiol promote cell proliferation of MCF-7 breast cancer cells: new insights into their synergistic effects. *Mol. Pathol.* **54**: 149 – 54.
- ENDO H., SASAKI H., MARUYAMA K., TAKEYAMA K., WAGA I., SHIMIZU T., KATO S. & KAWASHIMA H. 1997. Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**: 99 – 102.

- EVERSON W.V. & SMART E.J. 2001. Influence of caveolin, cholesterol, and lipoproteins on nitric oxide synthase. *Trends Cardiovasc. Med.* **11**: 246 – 50.
- FAYE J.C., TOULAS C. & BAYARD F. 1989. Differential estrogenic responsiveness of MCF-7 cells. Relationship to the presence of two different estrogen receptors. *J. Recept. Res.* **9**: 203 – 19.
- FERON O. & BALLIGAND J-L. 2006. Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide synthase in the heart. *Cardiovasc. Res.* **69**: 788 – 97.
- FIGTREE G.A., McDONALD D., WATKINS H & CHANNON K.M. 2003. Truncated estrogen receptor  $\alpha$  46-kDa isoform in human endothelial cells. Relationship to acute activation of nitric oxide synthase. *Circulation* **107**: 120 – 6.
- FOX S.W. & CHOW J.W.M. 1998. Nitric oxide synthase expression in bone cells. *Bone* **23**: 1 – 6.
- GARCÍA-MORENO C., CATALÁN M.P., ORTIZ A., ALVAREZ L. & DE LA PIEDRA C. 2004. Modulation of survival in osteoblasts from postmenopausal women. *Bone* **35**: 170 – 7.
- GENNARI L., MERLOTTI D., DE PAOLA V., CALABRÒ A., BECHERINI L., MARTINI G. & NUTI R. 2005. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* **161**: 307 – 20.
- HALL J.M., COUSE J.F. & KORACH K.S. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **276**: 36869 – 72.

- HERYNK M.H. & FUQUA S.A.W. 2004. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr. Rev.* **25**: 869 – 98.
- HIRATA S., SHODA T., KATO J. & HOSHI K. 2003. Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends Endocrinol. Metab.* **14** : 124 – 9.
- HODGIN J.B. & MAEDA N. 2002. Minireview: estrogen and mouse models of atherosclerosis. *Endocrinol.* **143**: 4495 – 501.
- HUGHES F.J., TURNER W., BELIBASAKIS G. & MARTUSCELLI G. 2006. Effects of growth factors and cytokines on osteoblasts differentiation. *Periodontol. 2000* **41**: 48 – 72.
- IKEGAMI A., INOUE S., HOSOI T., KANEKI M., MIZUNO Y., AKEDO Y., OUCHI Y. & ORIMO H. 1994. Cell cycle-dependant expression of estrogen receptor and effect of estrogen on proliferation of synchronized human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinology* **135**: 782 – 9.
- INCERPI S., D'AREZZO S., MARINO M., MUSANTI R., PALLOTTINI V., PASCOLINI A. & TRENTALANCE A. 2003. Short-term activation by low 17 $\beta$ -estradiol concentrations of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in rat aortic smooth muscle cells: physiopathological implications. *Endocrinology* **144**: 4315 – 24.
- INOUE S., OGAWA S., HORIE K., HOSHINO S., GOTO W., HOSOI T., TSUTSUMI O., MURAMATSU M. & OUCHI Y. 2000. An estrogen receptor  $\beta$  isoform that lacks exon 5 has dominant negative activity on both ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**: 814 – 9.
- ISSHIKI M. & ANDERSON R.G.W. 1999. Calcium signal transduction from caveolae. *Cell Calcium* **26**: 201 – 6.

- JAYACHANDRAN M., HAYASHI T., SUMI D., IGUCHI A. & MILLER V.M. 2001. Temporal effects of 17 $\beta$ -estradiol on caveolin-1 mRNA and protein in bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281**: H1327 – 33.
- KELLY M.J. & LEVIN E.R. 2001. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**: 152 – 6.
- KOUSTENI S., BELLIDO T., PLOTKIN L.I., O'BRIEN C.A., BODENNER D.L., HAN L., HAN K., DIGREGORIO G.B., KATZENELLENBOGEN J.A., KATZENELLENBOGEN B.S., ROBERSON P.K., WEINSTEIN R.S., JILKA R.L. & MANOLAGAS S.C. 2001. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* **104**: 719 – 30.
- KOUSTENI S., CHEN J.R., BELLIDO T., HAN L., ALI A.A., O'BRIEN C.A., PLOTKIN L., FU Q., MANCINO A.T., WEN Y., VERTINO A.M., POWERS C.C., STEWART S.A., EBERT R., PARFITT A.M., WEINSTEIN R.S., JILKA R.L. & MANOLAGAS S.C. 2002. Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science* **298**: 843 – 6.
- KOUSTENI S., HAN L., CHEN J.R., ALMEIDA M., PLOTKIN L.I., BELLIDO T. & MANOLAGAS S.C. 2003. Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J. Clin. Invest.* **111**: 1651 – 64.
- LAJEUNESSE D., FRONDOZA C., SCHOFFIELD B. & SACKTOR B. 1990. Osteocalcin secretion by the human osteosarcoma cell line MG-63. *J. Bone Miner. Res.* **5**: 915 – 22.
- LEVIN E.R. 2001. Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogens receptors. *J. Appl. Physiol.* **91**: 1860 – 7.

- LEWANDOWSKI S., KALITA K. & KACZMAREK L. 2002. Estrogen receptor  $\beta$ . Potential functional significance of a variety of mRNA isoforms. *FEBS Lett.* **524**: 1 – 5.
- LOFTHOUSE R.A., DAVIS J.R., FRONDOZA C.G., JINNAH R.H., HUNGERFORD D.S. & HARE J.M. 2001. Identification of caveolae and detection of caveolin in normal human osteoblasts. *J. Bone Joint Surg. Br.* **83**: 124 – 9.
- LUO X.H. & LIAO E.Y. 2003. Effects of estriol and differentiation of human osteoblastic MG-63 cells. *Endocr. Res.* **29**: 343 – 51.
- MANOLAGAS S.C. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* **21**: 115 – 37.
- MATTHEWS J. & GUSTAFSSON J.-A. 2003. Estrogen signaling: a subtle balance between ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Mol. Interv.* **3**: 281 – 92.
- MICHEL T. 1999. Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**: 1361 – 6.
- MIGLIACCIO A., CASTORIA G., DI DOMENICO M., DE FALCO A., BILANCIO A., LOMBARDI M., BOTTERO D., VARRICCHIO L., NANAYAKKARA M., ROTONDI A. & AURICCHIO F. 2003. Sex steroid hormones act as growth factors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **83**: 31 – 5.
- MUNDY G.R. 1993. Bone Resorbing Cells. *In* Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism; *Editors Favus M.J. et al.* Second edition, Raven Press, New York.



- NODA M. 2006. Current topics in pharmacological research on bone metabolism: regulation of bone mass by the function of endogenous modulators of bone morphogenetic protein in adult stage. *J. Pharmacol. Sci.* **100**: 211 – 4.
- OKAMOTO T., SCHLEGEL A., SCHERER P.E. & LISANTI M.P. 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing “preassembled signaling complexes” at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **273**: 5419 – 22.
- O'SHAUGHNESSY M.C., POLAK J.M., AFZAL F., HUKKANEN M.V.J., HUANG P., MACINTYRE I. & BUTTERY L.D.K. 2000. Nitric oxide mediates 17 $\beta$ -estradiol-stimulated human and rodent osteoblast proliferation and differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**: 604 – 10.
- PARINI P., ANGELIN B., STAVRÉUS-EVERS A., FREYSCHUSS B., ERIKSSON H. & RUDLING M. 2000. Biphasic effects of the natural 17 $\beta$ -estradiol on hepatic cholesterol metabolism in intact female rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**: 1817 – 23.
- PARTON R.G. 2001. Life without caveolae. *Science* **293**: 2404 – 5.
- PAVAO M. & TRAISH A.M. 2001. Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection, localization and analyses of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ . *Steroids* **66**: 1 – 16.
- PERRET S., DOCKERY P. & HARVEY B.J. 2001. 17 $\beta$ -oestradiol stimulates capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in human endometrial cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **176**: 77 – 84.

- POOLA I., ABRAHAM J. & BALDWIN K. 2002. Identification of ten exon deleted ER $\beta$  mRNAs in human ovary, breast, uterus and bone tissues: alternate splicing pattern of estrogen receptor  $\beta$  mRNA is distinct from that of estrogen receptor  $\alpha$ . *FEBS Lett.* **516**: 133 – 8.
- PUZAS J.E. 1993. The osteoblast. *In* Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism; *Editors Favus M.J. et al.* Second edition, Raven Press, New York.
- QUINN J.M.W. & GILLESPIE M.T. 2005. Modulation of osteoclast formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**: 739 – 45.
- RAISZ L.G. 2005. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest.* **115**: 3318 – 25.
- RAO L.G., LIU L. J.-F., MURRAY T.M., McDERMOTT E. & ZHANG X. 2003. Estrogen added intermittently, but not continuously, stimulates differentiation and bone formation in SaOS-2 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **26**: 936 – 45.
- RAZANDI M., ALTON G., PEDRAM A., GHONSHANI S., WEBB P. & LEVIN E.R. 2003. Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor  $\alpha$  at the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 1633 – 46.
- RAZANDI M., OH P., PEDRAM A., SCHNITZER J. & LEVIN E.R. 2002. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol. Endocrinol.* **16**: 100 – 15.
- RAZANI B. & LISANTI M.P. 2001. Caveolins and caveolae: molecular and functional relationships. *Exp. Cell Res.* **271**: 36 – 44.

- RAZANI B., WOODMAN S.E. & LISANTI M.P. 2002. Caveolae: From cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.* **54**: 431 – 67.
- RICCARDI D. 2000. Calcium ions as extracellular, first messengers. *Z. Kardiol. Suppl.* **89**: 9 – 14.
- RUSSELL K.S., HAYNES M.P., SINHA D., CLERISME E. & BENDER J.R. 2000. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 5930 – 5.
- SEGARS J.H. & DRIGGERS P.H. 2002. Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes. *Trends Endocrinol. Metab.* **13**: 349 – 54.
- SCHLEGEL A., WANG C., KATZENELLENBOGEN B.S., PESTELL R.G. & LISANTI M.P. 1999. Caveolin-1 potentiates estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) signaling. Caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ER $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **274**: 33551 – 6.
- SCHLEGEL A., WANG C., PESTELL R.G. & LISANTI M.P. 2001. Ligand-independent activation of estrogen receptor  $\alpha$  by caveolin-1. *Biochem. J.* **359**: 203 – 10.
- SHANKER Y.G., SHETTY U.P. & RAO A.J. 1998. Regulation of low density lipoprotein receptor mRNA levels by estradiol 17 $\alpha$  and chorionic gonadotropin in human placenta. *Mol. Cell. Biochem.* **187**: 133 – 9.
- SKOUBY S.O. 2004. Climacteric medicine: European Menopause And Andropause Society (EMAS) statements on postmenopausal hormonal therapy. *Maturitas* **48**: 19 – 25.

- SMART E.J., YING Y-S., CONRAD P.A. & ANDERSON R.G.W. 1994. Caveolin moves from caveolae to the golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J. Cell Biol.* **127**: 1185 – 97.
- SMART E.J., YING Y-S., MINEO C. & ANDERSON R.G.W. 1995. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 10104 - 8.
- SMITH P.M., COWAN A. & WHITE B.A. 2004. The low-density lipoprotein receptor is regulated by estrogen and forms a functional complex with the estrogen-regulated protein ezrin in pituitary GH<sub>3</sub> somatolactotropes. *Endocrinol.* **145**: 3075 – 83.
- SOLOMON K.R., ADOLPHSON L.D., WANK D.A., MCHUGH K.P. & HAUSCHKA P.V. 2000a. Caveolae in human and murine osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* **15**: 2391 – 401.
- SOLOMON K.R., DANCIU T.E., ADOLPHSON L.D., HECHT L.E. & HAUSCHKA P.V. 2000b. Caveolin-enriched membrane signaling complexes in human and murine osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* **15**: 2380 – 90.
- SÖMJEN D., KOHEN F. & LIEBERHERR M. 1997. Nongenomic effects of an anti-idiotypic antibody as an estrogen mimetic in female human and rat osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* **65**: 53 – 66.
- STEPHAN J.J., ALENFELD F., BOIVIN G., FEYEN J.H.M. & LAKATOS P. 2003. Mechanisms of action of antiresorptive therapies of postmenopausal osteoporosis. *Endocr. Regul.* **37**: 227 – 40.

- STOSS F., BARNETT D.H., FRASOR J., KOMM B., LYTTLE C.R. & KATZENELLENBOGEN B.S. 2004. Transcriptional profiling of estrogen-regulated gene expression via estrogen receptor (ER)  $\alpha$  or ER $\beta$  in human osteosarcoma cells: distinct and common target genes for these receptors. *Endocrinology* **145**: 3473 – 86.
- TERMINE J.D. 1993. Bone matrix proteins and the mineralization process. *In* Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism; *Editors* Favus M.J. *et al.* Second edition, Raven Press, New York.
- THIJSSSEN J.H.H. 2003. Overview on the effects of progestins on bone. *Maturitas* **46S1**: S77 – 87.
- THOMAS D., TOVEY S.C., COLLINS T.J., BOOTMAN M.D., BERRIDGE M.J. & LIPP P. 2000. A comparison of fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca<sup>2+</sup> signals. *Cell Calcium* **28**: 213 – 23.
- TROEN B.R. 2003. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Exp. Gerontol.* **38**: 605 – 14.
- TURI A., KISS A.L. & MÜLLNER N. 2001. Estrogen downregulates the number of caveolae and the level of caveolin in uterine smooth muscle. *Cell Biol. Int.* **25**: 785 – 94.
- VANDERSCHUEREN D., VANDENPUT L., BOONEN S., LINDBERG M.K., BOUILLON R. & OHLSSON C. 2004. Androgens and bone. *Endocr. Rev.* **25**: 389 – 425.
- VAN'T HOF R.J. & RALSTON S.H. 2001. Nitric oxide and bone. *Immunology* **103**: 255 – 61.

- WAKELING A.E. 2000. Similarities and distinctions in the mode of action of different classes of antiestrogens. *Endocr. Relat. Cancer* **7**: 17 – 28.
- WATANABE T., AKISHITA M., NAKAOKA T., HE H., MIYAHARA Y., YAMASHITA N., WADA Y., ABURATANI H., YOSHIZUMI M., KOZAKI K. & OUCHI Y. 2004. Caveolin-1, Id3a and two LIM protein genes are upregulated by estrogen in vascular smooth muscle cells. *Life Sci.* **75**: 1219 – 29.
- WIREN K.M., TOOMBS A.R., SEMIRALE A.A. & ZHANG X. 2006. Osteoblast and osteocyte apoptosis associated with androgen action in bone: requirement of increased Bax/Bcl-2 ratio. *Bone* **38**: 637 – 51.
- WOODMAN O.L., MISSEN M.A. & BOUJAOUDE M. 2004. Daidzein and 17 $\beta$ -estradiol enhance nitric oxide synthase activity associated with an increase in calmodulin and a decrease in caveolin-1. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **44**: 155 – 63.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2003. Prevention and management of osteoporosis: report of a WHO Scientific Group. *World Health Organization Technical Report Series* **921**.
- WU T.-W., WANG J.M., CHEN S. & BRINTON R.D. 2005. 17 $\beta$ -estradiol induced Ca<sup>2+</sup> influx via L-type calcium channels activates the Src/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and Bcl-2 expression in rat hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprotection. *Neuroscience* **135**: 59 – 72.
- ZHU W. & SMART E.J. 2003. Caveolae, estrogen and nitric oxide. *Trends Endocrinol. Metab.* **14**: 114 – 7.

ZIVADINOVIC D. & WATSON C.S. 2005. Membrane estrogen receptor- $\alpha$  levels predict estrogen-induced ERK1/2 activation in MCF-7 cells. *Breast Cancer Res.* **7**: R130 – 44.

ZSCHOCKE J., MANTHEY D., BAYATTI N. & BEHL C. 2003. Functional interaction of estrogen receptor  $\alpha$  and caveolin isoforms in neuronal SK-N-MC cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **84**: 167 – 70.

ZSCHOCKE J., MANTHEY D., BAYATTI N., VAN DER BURG B., GOODENOUGH S. & BEHL C. 2002. Estrogen receptor  $\alpha$ -mediated silencing of caveolin gene expression in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 38772 – 80.